



FACULTADE DE MEDICINA E ODONTOLOXÍA
Departamento de Estomatoloxía

**DETERMINACIÓN DE *ATP6V1C1* EN MUESTRAS DE
CITOLOGÍA EXFOLIATIVA DE LA CAVIDAD ORAL:
IMPLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DEL
CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS. UN
ESTUDIO PRELIMINAR.**

Autor: MARIO PÉREZ SAYÁNS

Santiago de Compostela, Enero de 2010

D. ABEL GARCÍA GARCÍA, Profesor Titular de Cirugía Oral y Maxilofacial de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela; D. FRANCISCO BARROS ANGUEIRA, Doctor en Biología y Jefe de Laboratorio de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica del SERGAS; y D. JOSÉ MANUEL GÁNDARA REY, Catedrático de Medicina Oral de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “DETERMINACIÓN DE *ATP6V1C1* EN MUESTRAS DE CITOLOGÍA EXFOLIATIVA DE LA CAVIDAD ORAL: IMPLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DEL CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS. UN ESTUDIO PRELIMINAR”, ha sido elaborada, por D. MARIO PÉREZ SAYÁNS bajo nuestra dirección, y hallándose concluida, autorizamos su presentación a fin de que pueda ser defendida ante el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, se expide la presente certificación en Santiago de Compostela, a 15 de Enero de 2010.

Prof. Dr. D. Abel García García

Dr. D. Francisco Barros Angueira

Prof. Dr. D. José Manuel Gándara Rey

AGRADECIMIENTOS

A Abel, por su confianza, su apoyo, su gran dedicación a la investigación y desde luego su amistad, que me ha demostrado día día y la cual espero nos una por mucho tiempo.

Al Dr. Francisco Barros Angueira, por su apoyo y dedicación, sin la cual esta Tesis Doctoral no habría sido posible.

Al Dr. José Manuel Gándara Rey, por la sabiduría que ha sabido trasladarme y su apoyo incondicional, tanto académico como personal.

Al Dr. Aguirre y su equipo, por su disponibilidad ante cualquier proyecto y su importante aportación a esta Tesis.

A la Dra. Pilar Gayoso Diz, por su paciencia y su desinteresada e indispensable ayuda.

Al Dr. José Ramón Antúnez López, por su inestimable colaboración en la investigación.

A Loli, no sólo por haber sufrido y padecido el día a día, noche a noche de mi Tesis, sino por colaborar activamente en la parte experimental.

A mi madre y a Chema, porque sin su ayuda, apoyo y comprensión, habría sido imposible la gran dedicación que ha requerido esta Tesis Doctoral.

A Manuel Somoza, Eva Otero y Marcio Dínez, por haber iniciado el duro camino de la genética en nuestro Departamento, que me ha permitido desarrollar esta Tesis doctoral.

A María José, porque detrás de un gran hombre, siempre hay una gran mujer.

A mis compañeros y alumnos del Máster por estar ahí siempre que los he necesitado.

A mis grandes y verdaderos amigos: Sandra, Lupe, Paula, Ana y los Migueles, por respetar y apoyar mi decisión, así como entender el “abandono” al que los he sometido, gracias por estar ahí.

*A mis padres,
por inculcar mi espíritu de superación*

ÍNDICE

I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	14
II. INTRODUCCIÓN	20
II.1. CÁNCER ORAL	22
II.1.1. Concepto	22
II.1.2. Epidemiología	23
II.1.3. Clínica y topografía	25
II.1.4. Etiopatogenia	27
II.1.5. Estadiaje	31
II.1.6. Pronóstico y tratamiento	32
II.2. BASES GENÉTICAS Y MOLECULARES DEL CÁNCER ORAL	36
II.2.1. Ciclo celular	36
II.2.2. Oncogenes	39
II.2.3. Genes supresores de tumores	40
II.2.4. Mecanismos epigenéticos	44
II.2.5. Proliferación celular	45
II.2.6. Apoptosis y envejecimiento celular	47
II.2.7. Reparación de ADN e inmortalización	50
II.2.8. Angiogénesis	51
II.2.9. Invasión y metástasis	53
II.3. DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER ORAL	58
II.3.1. Diagnóstico histológico y ultraestructural	58
II.3.2. Inmunohistoquímica (IHQ)	60
II.3.3. Técnicas de biología molecular	61
II.3.3.1. PCR cuantitativa en tiempo real	64
II.3.3.2. Alteraciones genéticas en el carcinoma oral de células escamosas (COCE)	66
II.3.4. Citología exfoliativa	70
II.3.4.1. Concepto	71
II.3.4.2. Citología en base líquida	75
II.3.4.3. Análisis citológicos	78
	10

II.3.4.3.1. Citomorfometría	78
II.3.4.3.2. Contenido de ADN nuclear	80
II.3.4.3.3. Identificación de marcadores tumorales mediante IHQ	82
II.3.4.3.4. Análisis molecular. Marcadores moleculares citológicos	83
II.4. BOMBA DE PROTONES O ATP-asa	89
II.4.1. Bomba de protones tipo vacuolar o V-ATPasa. Funciones biológicas	89
II.4.2. V-ATPasas como bombas de protones ATP-dependientes	91
II.4.3. Estructura y regulación de las V-ATPasas. Subunidad C	94
II.4.4. <i>ATP6V1C1 (ATPase, H⁺ transporting, lysosomal 42kDa, VI subunit C, isoform I)</i>	105
III. MATERIAL Y MÉTODO	109
III.1. Selección de pacientes	111
III.2. Datos clínicos	111
III.2.1. Consumo de tabaco	111
III.2.2. Localización del tumor	112
III.2.3. Estadío del tumor	112
III.3. Selección del gen a estudio	112
III.4. Metodología de trabajo	113
III.4.1. Obtención de las muestras	113
III.4.2. Procesado de las muestras	114
III.4.2.1. Muestras para estudio inmunohistoquímico	114
III.4.2.2. Muestras para estudio molecular con PCRq-RT	115
III.5. Análisis del nivel de expresión	120
III.6. Análisis estadístico	120
III.7. Aspectos éticos	121
IV. RESULTADOS	123
IV.1. Características demográficas y clínicas	125
IV.1.1. Descriptivo	125
IV.1.1.1. Edad y sexo	125

IV.1.1.2. Consumo de tabaco	125
IV.1.1.3. Localización del tumor	125
IV.1.1.4.- Estadío del tumor	125
IV.1.2. Análisis de asociación entre características clínicas y demográficas	127
IV.1.2.1. Asociación entre casos/controles y sexo	127
IV.1.2.2. Distribución de hábito tabáquico según género en casos y controles	127
IV.1.2.3. Asociación entre localización y estadío TNM	127
IV.1.2.4. Asociación entre hábito tabáquico y estadío TNM	129
IV.2. Análisis de expresión de <i>ATP6VIC1</i> mediante inmunohistoquímica	130
IV.3. Análisis de expresión de <i>ATP6VIC1</i> mediante PCR-qRT	132
IV.3.1. Distribución de niveles de expresión de <i>ATP6VIC1</i>	132
IV.3.1.1 Expresión de <i>ATP6VIC1</i> en casos y controles	132
IV.3.1.2. Expresión de <i>ATP6VIC1</i> en el grupo caso en relación al sexo	134
IV.3.1.3. Expresión de <i>ATP6VIC1</i> en el grupo caso según localización	135
IV.3.1.4.- Expresión de <i>ATP6VIC1</i> en casos según hábito tabáquico	136
IV.3.2. Asociación de niveles de expresión de <i>ATP6VIC1</i> con estadío TNM	137
IV.3.3. Estudio de rentabilidad diagnóstica	138
 V. DISCUSIÓN	 143
 VI. CONCLUSIONES	 172
 VII. BIBLIOGRAFÍA	 176
 VIII. ANEXOS	 218
 VIII.1. Anexo 1: Distribución de <i>ATP6VIC1</i> en los distintos tejidos	 220
VIII.2. Anexo 2: Modelo de consentimiento informado	222
VIII.3. Anexo 3: Inhibidores de los reguladores del pH	226
VIII.4. Anexo 4: Publicaciones derivadas de la presente Tesis	227

I.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

El carcinoma oral de células escamosas (COCE), es la neoplasia maligna más frecuente de la cavidad oral y en su etiología están implicados una gran cantidad de factores exógenos y endógenos. Es la sexta neoplasia maligna que se diagnostica en el mundo, y su incidencia ha ido aumentando de forma progresiva desde el año 1970 constituyendo un problema importante de salud pública (1). Actualmente su incidencia anual es de 300.000 nuevos casos en todo el mundo (2).

El desarrollo del carcinoma oral de células escamosas (COCE) es un proceso multipaso que requiere la acumulación de múltiples alteraciones genéticas, influenciado por la predisposición genética del paciente así como por los factores medioambientales, incluyendo el tabaco, alcohol, inflamación crónica e infecciones virales. Todos estos factores, conducen a un amplio conjunto de alteraciones genéticas y moleculares que pueden ser determinadas mediante los diversos análisis moleculares (3,4).

Hoy por hoy, la biopsia sigue siendo la técnica clave para el diagnóstico definitivo del cáncer, sin embargo dado su carácter cruento, la necesidad de personal cualificado y los problemas inherentes a la técnica, es fundamental encontrar soluciones alternativas, que palien esta problemática (5,6). La citología exfoliativa es un método diagnóstico que permite obtener células orales de los pacientes, mediante una técnica mínimamente invasiva. A las clásicas aplicaciones del estudio citológico oral, como son las candidiasis orales, se han ido añadiendo otras como las lesiones precancerosas y el cáncer oral. Los métodos analíticos con los que podemos estudiar las muestras citológicas son diversos y los resultados de los mismos variables. El desarrollo de las técnicas de análisis molecular, los avances en el conocimiento del proceso etipatogénico del cáncer oral, así como las mejoras técnicas de la citología exfoliativa en base líquida, están despertando en la actualidad un interés creciente por esta técnica (7-9).

Nuestro grupo de investigación, ha realizado un estudio previo acerca del análisis de la expresión génica diferencial del COCE en relación al tejido oral normal, mediante *microarrays* de ADN (10). Decidimos centrarnos en los genes que muestran un aumento de actividad o sobreexpresión en el tejido tumoral y dentro de éstos, seleccionamos un

gen que cumple una serie de parámetros estadísticos y que puede ser interesante dada sus funciones biológicas, *ATP6V1C1* (11).

ATP6V1C1 es uno de los principales genes implicados en el control del funcionamiento de las V-ATPasas. Estas enzimas son las encargadas de expulsar protones desde el interior de la célula al medio extracelular. Las V-ATPasas que normalmente se localizan en la membrana de compartimentos ácidos intracelulares como endosomas y lisosomas, en el cáncer, se expresan también en la membrana plasmática para permitir la supervivencia de las células tumorales al medioambiente ácido. El desarrollo y mantenimiento de este gradiente es debido directamente a la habilidad de las células tumorales a secretar protones, acidificar el medio extracelular (12-14) y mantener alcalino el pH citosólico (15). De la misma manera, las V-ATPasas parecen estar relacionadas con los fenómenos de resistencia a multidroga antineoplásicas (16,17) y su bloqueo mediante inhibidores específicos parece tener efectos anticancerígenos, en cuanto al bloqueo del crecimiento tumoral (18-20), reducción de metástasis (21,22) y reducción de la supervivencia de las células tumorales (23,24).

Las V-ATPasas, están formadas por un dominio citosólico V1 y un dominio intramembranoso V0. Para muchos autores, la función más importante de la subunidad C1 de las V-ATPasas (controlada por el gen *ATP6V1C1*), es el control de la disociación reversible de la holoenzima V1V0, en subcomplejos V1 y V0, a través de la ocupación de la V-ATPasa por nucleótidos (25), los cambios conformacionales en su estructura (26) y la unión de ésta a la F-actina próxima a la membrana basal de las células epiteliales (29). Por lo tanto podemos considerar a la subunidad C1, como la máxima responsable de la función y regulación de las V-ATPasas (27,28).

OBJETIVOS

1. Determinar los niveles de expresión del gen *ATP6V1C1* mediante PCR-qRT en muestras de COCE y mucosa oral normal, obtenidas mediante citología exfoliativa.
2. Describir la expresión de la proteína ATPasa C1 (subunidad C1), en células epiteliales de la mucosa oral normal y en células neoplásicas en el COCE.

3. Determinar la implicación de los niveles de *ATP6V1C1* en el diagnóstico y el pronóstico del COCE.

II.- INTRODUCCIÓN

II.1.- CÁNCER ORAL

II.1.1. CONCEPTO

Teniendo en cuenta los aspectos básicos de actualidad podríamos definir el cáncer como un grupo grande y heterogéneo de enfermedades cuyo, factor común es un desequilibrio que se produce en la relación proliferación/muerte celular, a favor de la acumulación de células, provocado por mecanismos genéticos o epigenéticos. Las alteraciones genéticas pueden ser congénitas, adquiridas o ambas y son producidas por mutaciones de etiología multifactorial en cualquier célula susceptible del organismo, alterando en un inicio el funcionamiento normal de algunos genes involucrados en la proliferación celular, apoptosis, envejecimiento celular y reparación del ADN y, posteriormente, otros genes relacionados con los procesos de angiogénesis, invasión, motilidad, adhesión y metastatización, entre otros, cuya expresión cuantitativa y cualitativa confiere a dicha célula características fenotípicas y biológicas de malignidad que se traducen morfológica y evolutivamente en crecimiento y diseminación en sus diferentes modalidades y en grado variable, según particularidades biológicas del tumor, anatómicas de su localización y generales del huésped (30). De cada uno de estos parámetros hablaremos en detalle más adelante.

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) se considera como una neoplasia maligna de origen epitelial. Es la neoplasia más frecuente de la cavidad oral y representa entre un 90 y un 95% de todas las lesiones malignas de la boca, por lo que será considerado como sinónimo de cáncer oral (31).

Al contrario que en otras áreas del cuerpo, los límites de la cavidad oral no siempre son fáciles de definir. Como consecuencia, la definición exacta del cáncer oral respecto a su localización, ha demostrado ser una tarea extremadamente difícil tanto para los clínicos como para los investigadores (30).

En la mayoría de los trabajos, los tumores de los labios y glándulas salivales son excluidos dentro del término cáncer oral, debido a su distinta estructura histológica y a la exposición del labio al sol. Aunque clásicamente se consideraba que el cáncer oral comprendía todas las neoplasias malignas que afecten los labios, la lengua y los tejidos

intraorales, incluida la orofaringe (32), en la última edición de la Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), Moore et al., sugieren que las lesiones asentadas en la porción móvil de la lengua, suelo de boca, mucosa yugal, mucosa del reborde alveolar superior e inferior y paladar, deben ser agrupadas bajo la denominación de cáncer oral, y que el cáncer de labio, orofaringe y de glándulas salivales deben ser analizados separadamente (33).

II.1.2. EPIDEMIOLOGÍA

El carcinoma epidermoide, o carcinoma de células escamosas de la cavidad oral es la neoplasia maligna más frecuente de la cavidad oral, constituyendo un problema importante de salud pública. Es la sexta neoplasia maligna que se diagnostica en el mundo, y su incidencia ha ido aumentando de forma progresiva desde el año 1970 (1). Actualmente su incidencia anual es de 300.000 nuevos casos en todo el mundo (2). De éstos, aproximadamente 50,000 casos ocurren en Estados Unidos y Europa.

A pesar de los considerables avances en las técnicas quirúrgicas, junto con otras modalidades de tratamiento coadyuvantes añadidas, el pronóstico global de los pacientes que sufren esta enfermedad no ha mejorado en las últimas dos décadas. El tratamiento generalmente da lugar a un deterioro del habla, la masticación y la deglución, así como deformidad estética y trastornos psicológicos (34).

Su incidencia en relación con la localización geográfica es muy variable, observándose grandes diferencias entre diferentes regiones, incluso dentro del mismo país. En Estados Unidos representa entre el 2 y el 4 por ciento de todos los tumores malignos del organismo, mientras que en el sur y sudeste de Asia, su prevalencia aumenta a un 30 o incluso un 40 por ciento, como consecuencia del hábito de mascar tabaco (nuez de betel) o de dejarlo depositado en el suelo de la boca (35,36).

Durante 1978 se identificaron 660,000 casos de cáncer, 67,000 de estos casos afectaban a la cabeza y a la región cervical. Excluyendo las neoplasias de sistema nervioso central, de ojos, de tiroides y los sarcomas, linfomas y melanomas cutáneos, lo que representa unos 30,000 casos, existían 37000 nuevos casos de carcinoma de células escamosas bucales, que representaron un 2,6 % de todos los nuevos casos de cáncer anuales (37).

En el año 2000, la OMS estimó la cantidad de 1,220,100 nuevos casos de cáncer invasivo, de los cuales 30,200 eran orofaríngeos. La incidencia era del 3% para los tumores de esta localización (38). Otros estudios han estimado la incidencia de todos los tipos de cáncer bucal en un 5% de los nuevos casos de cáncer anuales. Otra vez, la inmensa mayoría de estas lesiones eran COCE. Según la Sociedad Americana del Cáncer, la estadística a 24 de junio de 2008 es de 1,437,180 nuevos casos de cáncer en E.E.U.U. y un pronóstico de 565,650 muertes para 2008. De éstos, 22,900 se localizan en la cavidad oral en ambos sexos, representando el 3% de todos los cánceres del organismo (39).

En España la incidencia del cáncer oral es de 12 a 15 casos/100.000 habitantes/año en varones y de 2 a 4 casos/100.000 habitantes/año en mujeres, y representa entre el 2 y el 3% de todas las muertes por cáncer en nuestro país (40).

La relación varón/mujer también varía en las distintas series mundiales entre 1,2-3,8:1. Sin embargo, esta proporción está modificándose en los últimos años, existiendo una tendencia hacia el equilibrio intersexual, justificado por el mayor consumo de tabaco y alcohol por parte de las mujeres (41). Además, esta relación entre ambos sexos varía según las distintas localizaciones en la cavidad oral. Así, el carcinoma de encía o reborde alveolar es más frecuente en las mujeres (42).

Más del 90% de los pacientes con cáncer oral son mayores de 45 años, siendo la edad media de presentación alrededor de los 60 años (43). Entre el 1 y el 3% de todos los COCE, aparecen en pacientes menores de 40 años (44,45). Según varios autores la supervivencia de los pacientes jóvenes (menores de 45 años) con COCE a 5 años, es superior a la de pacientes de mayor edad (46,47). No obstante, existe un grupo de pacientes menores de 20 años que manifiestan COCE de encía sin causas etiológicas aparentes (48).

II.1.3. CLÍNICA Y TOPOGRAFÍA

El carcinoma epidermoide de la cavidad oral es una neoplasia maligna que deriva del epitelio plano poliestratificado que tapiza la cavidad oral. Inicialmente se localiza en el propio epitelio, denominándose carcinoma *in situ*. Con el tiempo, invade y destruye estructuras vecinas, como músculo, hueso o glándulas salivales. Este proceso de crecimiento y de invasión se desarrolla generalmente durante varios meses, desde un tumor localizado de pocos milímetros, hasta una masa de importantes dimensiones que destruye estructuras vecinas. Durante este período de crecimiento localizado, el tumor produce metástasis en los ganglios linfáticos cervicales, generalmente en los más próximos al drenaje linfático del tumor primario, extendiéndose progresivamente a otros ganglios linfáticos más alejados y rompiendo los límites anatómicos de dichos ganglios, afectando a las estructuras anatómicas del cuello (49).

En algunas ocasiones la lesión puede presentar un carácter exofítico (50). También han sido halladas en la cavidad oral, otras variedades infrecuentes como el carcinoma adenoescamoso (51).

Cuanto mayor es el tumor primario y más larga su evolución, mayor es la probabilidad de que presente afectación de los ganglios linfáticos cervicales. Sin embargo, tumores pequeños y de corta evolución también pueden producir metástasis ganglionares. En ocasiones, la presencia de una metástasis en un ganglio cervical, puede ser el primer síntoma de un COCE de la cavidad oral, siendo esto más frecuente en tumores primarios de hipofaringe o nasofaringe (6).

Haya et al., encuentran que el 19,6% de los pacientes con COCE presentan una leucoplasia asociada a la lesión primaria en el momento del diagnóstico. La presencia de leucoplasia asociada al tumor primario, se correlacionó con tumores en estadios más tempranos (52).

El COCE de la cavidad oral puede producir metástasis a distancia a cualquier órgano del cuerpo, aunque ésta no es la causa más frecuente del fallecimiento de los pacientes. La muerte suele sobrevenir por la falta de control locorregional de la enfermedad, es decir, por la afectación local del tumor primario y la afectación regional a nivel del cuello (53).

En cuanto a su localización, si no se considera el cáncer de labio inferior, son la lengua y el suelo de boca las regiones donde con más frecuencia se asientan las lesiones de COCE, seguido por la mucosa yugal, la gingival y el paladar blando. Según la localización intraoral de la lesión primaria, el COCE puede presentar características distintas (54).

En cuanto a la lengua, las superficies póstero-laterales y la cara ventral de la lengua representan casi la totalidad de los COCE en esta localización. El dorso de la lengua representa una pequeña fracción de estas lesiones y suele asociarse a una lesión crónica de liquen plano oral erosivo, lesiones de sífilis terciaria y lesiones asociadas a la exposición crónica al arsénico. La porción no oral u orofaríngea de la lengua, cuando está afectada por un COCE, suele dar lugar a síntomas similares a los de una faringitis con distintos grados de disfagia u odinofagia (55).

El carcinoma de suelo de boca representa aproximadamente 1/3 de todos los carcinomas orales, y se ha constatado un aumento en la frecuencia de carcinomas en esta localización en mujeres. La existencia de lesiones precancerosas, leucoplasia o eritroplasia, es frecuente en esta localización. La porción anterior del suelo de boca, en las proximidades del frenillo lingual y de los ductos de las glándulas submandibulares, es la zona que se afecta con más frecuencia, apareciendo como una lesión ulcerosa de márgenes irregulares e indurados. En estadios avanzados, puede ocurrir extensión hacia la encía y en profundidad hacia la lengua, haciendo que la fijación de la lengua sea un hallazgo común (56,57).

En el reborde alveolar, el COCE representa aproximadamente el 5% de todos los carcinomas intraorales, y frecuentemente se presenta como una lesión indolora en los sectores posteriores de la mandíbula. La invasión ósea es un hallazgo precoz encontrado con cierta frecuencia. Según Pathak et al., la supervivencia en COCE de encía maxilar a los 5 años es del 48,8% (58).

La mucosa yugal representa aproximadamente el 2% de los COCE. Suelen ser asintomáticos. En fases iniciales, las lesiones tienden a localizarse en las zonas más posteriores, presentándose con frecuencia como una pequeña úlcera o masas induradas que se relacionan con una leucoplasia preexistente, y con mucha menor frecuencia, con

una eritroplasia. Dada la localización primaria de estas lesiones, frecuentemente se asocian a un traumatismo debido a la función masticatoria diaria, lo que conlleva a la ulceración de estas lesiones. En estadíos más avanzados pueden llegar a presentar trismus (49). El COCE localizado en la mucosa yugal no es frecuente en América del norte ni en Europa occidental. Sin embargo, en otras partes del mundo, particularmente en el sudeste asiático, es una localización mucho más frecuente, lo que se atribuye al hábito de mascar “betel” y tabaco (42).

En cuanto al paladar, los COCE de paladar duro son relativamente raros. Morfológicamente en esta localización suelen adoptar un aspecto ulcerado o verrucoso, a menudo rodeado por una leucoplasia. Cuando se consideran los paladares blando y duro como localizaciones independientes, el 71% de los COCE afectan al paladar blando y el 29% al paladar duro (49).

Por último, en la región del triángulo retromolar comprende la mucosa adherida que discurre sobre la rama ascendente de la mandíbula desde la superficie distal del último molar inferior hasta la zona adyacente a la tuberosidad maxilar. El triángulo retromolar y el paladar blando adyacente, representan aproximadamente un 15% de los COCE. En estas localizaciones, la presencia de leucoplasias no homogéneas o eritroplasias, que preceden a la lesión maligna, son un hallazgo común (59).

II.1.4. ETIOPATOGENIA

El proceso carcinogénico está modulado por multitud de factores tanto ambientales como genéticos. Ya Boyd y Reade en 1988 describen los mecanismos carcinogénicos que afectan particularmente a la mucosa oral, diferenciando tres grupos fundamentales: químicos, físicos y virales (3).

De manera general, el consumo de tabaco en sus varias formas y su asociación con el consumo de alcohol, son los factores de riesgo más importantes en el desarrollo del cáncer oral. Ambos factores actúan sinérgicamente, aunque cada uno de ellos posee potenciales carcinogénicos independientes (57). Se estima que 75% de todos los COCE en los países occidentales se atribuye al consumo de alcohol y tabaco (60). La asociación de tabaco y alcohol está íntimamente relacionada, no sólo con el desarrollo

del cáncer oral, sino también con el curso de la enfermedad, estando ligada a un mal pronóstico (61).

El hábito de fumar sigue siendo el principal factor de riesgo del cáncer oral (Figura 1) y los fumadores presentan un riesgo relativo 7 veces más alto en relación a los no fumadores. Este riesgo es muchas veces más alto en los fumadores que tienen un alto consumo de alcohol. Hay evidencias que sugieren que con el cese del hábito de fumar después de un periodo de 10 años, este riesgo elevado se reduce a niveles cercanos a los de personas que nunca han fumado (62). Esta información puede ser útil a la hora de motivar a los pacientes para que dejen de fumar.

Además del hábito de fumar, el uso de tabaco, sea en la forma de snuff (tabaco fino molido) o tabaco de mascar (hojas sueltas de tabaco), han sido asociados al cáncer oral (63).

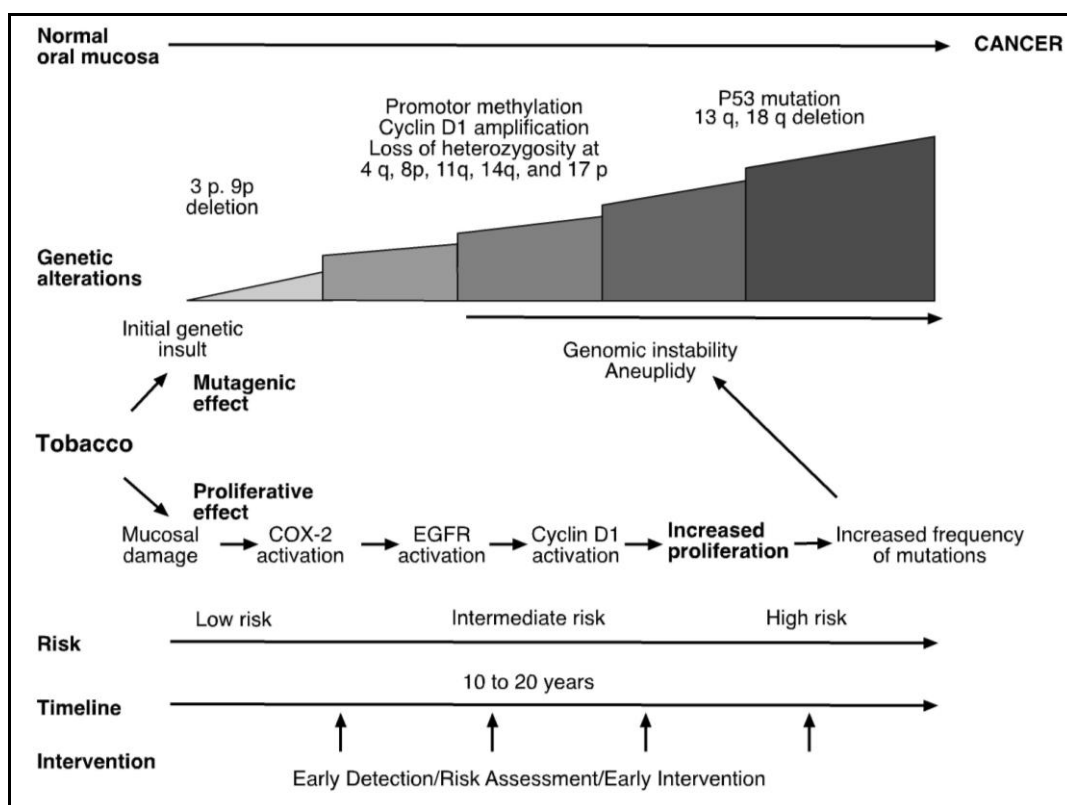


Figura 1. Esquema de desarrollo del cáncer oral (2).

El tabaco es un potente agente carcinogénico, con un bien documentado efecto mutagénico (64). La exposición crónica a los carcinógenos del tabaco en el tracto aerodigestivo superior, produce cambios genéticos en las células epiteliales de la mucosa oral. Las partículas de nicotina, alquitrán, así como el monóxido de carbono, pueden producir cambios en el ADN celular y por lo tanto iniciar la transformación de célula normal a célula neoplásica (65). La acumulación de cambios genéticos conduce a una inestabilidad genómica, desarrollo de lesiones premalignas y finalmente a carcinoma invasivo (2).

Paralelamente al efecto del tabaco sobre el material genético, el tabaco puede inducir actividad proliferativa a través de la activación del receptor del factor de crecimiento epitelial (*EGFR*) y su cascada de mecanismos, la cual incluye a *MAPK*, *ERK1* y *PKC-α*. Esto activa la ciclina D1, conduciendo al incremento de la actividad proliferativa y al incremento de la frecuencia de mutaciones, volviendo a las células más vulnerables a los cambios genéticos permanentes que en definitiva, propician la inestabilidad genómica y el carcinoma invasivo (66).

En cuanto al alcohol, ha sido demostrado que el acetaldehído, el primer metabolito del etanol, es carcinogénico (67).

Los hábitos dietéticos constituyen otro factor relevante en el desarrollo del cáncer oral, de forma más específica, la ingestión de micronutrientes con un efecto antioxidante. Compuestos naturales de caroteno, selenio dietético, folato y vitaminas A, C y E, parecen ofrecer efectos protectores contra el desarrollo del cáncer (68). Según La Vecchia et al., aproximadamente un 15% de los cánceres orales y orofaríngeos se pueden atribuir a deficiencias o desequilibrios dietéticos (60).

Recientemente se ha demostrado la relación etiológica entre el virus del papiloma humano (*HPV*) y el cáncer oral (69-73). Sin embargo, según Termine et al., después de realizar un meta-análisis desde 1988-2007 sobre la implicación del *HPV* en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), concluyen que son necesarios métodos más sensitivos de detección de DNA de *HPV* para determinar la influencia de dicho virus en dichos tumores (74). El virus de Epstein-Barr (*EBV*), está asociado al linfopitelioma de nasofaringe (carcinoma indiferenciado de nasofaringe),

encontrándose títulos de IgA elevados frente a dicho virus en pacientes que padecen esta enfermedad (75).

La infección crónica de los queratinocitos de la mucosa oral por *C. albicans*, puede tener su papel en la carcinogénesis oral. Una vez que el hongo estimula la proliferación de las células epiteliales *in vitro* y las lesiones orales de candidiasis muestran displasia epitelial (candidiasis hiperplásica crónica), pueden sufrir degeneración maligna (76). Recientes estudios, relacionan el anticuerpo monoclonal C7, generado contra la *C. albicans* como un factor pronóstico negativo en la evolución del COCE (77). Parece que el síndrome de APECED (poliendocrinopatía autoinmune PA, candidiasis, distrofia ectodérmica), enfermedad autosómica recesiva asociada a un defecto de linfocitos T y excepcionalmente común en Finlandia, parece favorecer el crecimiento de *C. albicans* y predispone a la mucositis crónica y al COCE (46,78).

En cuanto a las infecciones bacterianas, parece que el efecto carcinogénico es menos claro, aunque Hooper et al., han encontrado que la presencia de bacterias sacarolíticas y acidúricas es mayor en tejido tumoral que en mucosa normal. Se necesitan más estudios para determinar si la presencia de estas bacterias dentro de la mucosa contribuyen al proceso carcinogénico (79).

Otros factores etiológicos relacionados al cáncer oral, incluyen enfermedades como la diabetes, que envuelve al receptor insulínico *IRS-1* y al *FAK* (80) y la placa dental, relacionada con el COCE debido a la alta producción de acetaldehído por bacterias como *Streptococcus mitis*, *salivarius* e *intermedius* (81). La sífilis y la disfagia sideropénica son otras patologías relacionadas con el cáncer oral pero estadísticamente mucho menos significativas (68).

Sin embargo, a pesar de todos los factores etiológicos mencionados, el desarrollo del COCE es un proceso multifactorial con gran variabilidad entre unos individuos y otros. Hoy sabemos, que el desarrollo del cáncer en el hombre, está determinado por una compleja sucesión de eventos que normalmente tienen lugar a lo largo de muchos años. Parece claro que los factores genéticos y moleculares son decisivos en la carcinogénesis, por eso los vamos a desarrollar más adelante en un apartado específico.

II.1.5. ESTADIAJE

El estadio del cáncer oral depende del tamaño de la lesión primaria y de la diseminación regional o a distancia de la enfermedad. El estadio es importante, ya que tiene influencia sobre el plan de tratamiento y el pronóstico del cáncer oral. Dentro de las clasificaciones más utilizadas se encuentra la TNM, propuesta por el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (59) (Tabla 1).

Tumor primario (T)	
TX	Sin información sobre el tumor primario
T0	Sin evidencia del tumor primario
TIS	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor de menos de 2 cm de diámetro
T2	Tumor entre 2 y 4 cm de diámetro
T3	Tumor de más de 4 cm de diámetro
T4	Tumor de más de 4 cm de diámetro con afección del antro, los músculos pterigoideos, la base de la lengua o la piel
Ganglios linfáticos regionales (N)	
NX	Los ganglios pueden ser valorables o no
N0	Sin ganglios clínicamente positivos
N1	Un nódulo clínicamente positivo, homolateral y de diámetro < 3 cm
N2a	Un nódulo clínicamente positivo, homolateral de entre 3 y 6 cm de diámetro
N2b	Múltiples ganglios homolaterales clínicamente positivos, ninguno mayor de 6 cm de diámetro
N3a	Ganglios positivos homolaterales y mayores de 6 cm
N3b	Ganglios positivos clínicamente bilaterales y mayores de 6 cm
N3c	Ganglios positivos clínicamente contralaterales y mayores de 6 cm
Metástasis a distancia (M)	
MX	No se valoró las metástasis a distancia
M0	Sin evidencia de metástasis a distancia
M1	Con metástasis a distancia
Estadio/TNM	
I	T1N0M0
II	T2N0M0
III	T3N0M0
	T1, T2 o T3 N1M0
IV	Cualquier T4
	Cualquier N2 o N3
	Cualquier M1

Tabla 1. Clasificación TNM y estadiaje clínico. Extensión del tumor primario (T); Ausencia o presencia de afectación de ganglios linfáticos regionales (N); Ausencia o presencia de metástasis a distancia (M)

(82).

II.1.6. PRONÓSTICO Y TRATAMIENTO

El pronóstico depende de diversos factores como son: la clínica, la localización, el grado histológico, la presencia o no de metástasis y la clasificación TNM.

Aproximadamente 7.800 personas en Estados Unidos (5.100 varones, 2.700 mujeres) y 900 en el Reino Unido mueren por cáncer oral y sus complicaciones cada año. En España, se ha descrito un aumento de la mortalidad del cáncer oral durante el período de 1975 a 1994 (83).

Las tasas de curación del cáncer oral dependen de su estadio. La tasa de supervivencia a los 5 años es del 80% en estadios iniciales, 40% en neoplasias con afectación regional, y menos del 20% para pacientes con metástasis a distancia (84). La detección precoz aumenta significativamente la posibilidad de curación del paciente. Según Rautava et al., la supervivencia sin recurrencias a los 5 años fue mayor en los tumores cuyo origen era el epitelio del borde lateral de la lengua. Esto implica la necesidad de estudiar más profundamente las características moleculares de los diferentes tipos de epitelio oral con el fin de dilucidar posibles diferencias en la susceptibilidad de transformación maligna (85).

En el momento del diagnóstico del cáncer oral, el 36% de los pacientes presentan enfermedad localizada, un 43% presentan enfermedad con afectación regional, un 9% presentan metástasis a distancia, y para el 12% restante el estadio de la enfermedad no se puede identificar. Estos resultados deben considerarse malos si se tiene en cuenta que los COCE se forman en el epitelio superficial de la cavidad oral, por lo que producen cambios visibles precoces (64).

La detección precoz en estadios asintomáticos garantiza no sólo un aumento en las tasas de supervivencia, sino también una mejor calidad de vida, como consecuencia de tratamientos menos agresivos y mutilantes (57,68).

Una vez que se detectó positivamente la presencia de cáncer es necesario determinar las características del tumor. El estudio histológico de la neoplasia brinda información anatómo-patológica de la enfermedad, indispensable para la elaboración de una forma de tratamiento que responda a los rasgos celulares y de comportamiento de la masa tumoral (49).

Actualmente, la cirugía y la radioterapia son las dos modalidades de tratamiento con potencial curativo, y suelen ser empleadas individualmente o en combinación (86). El tratamiento del cáncer oral depende principalmente de la localización, del estadio de la lesión y del estado de salud general del paciente (87). Los márgenes resectivos de la lesión son fundamentales para un buen pronóstico del tumor (88); esto, junto con la profundidad invasiva, son factores críticos en la curación, no sólo de las recidivas locales, sino de la enfermedad en general (89).

Las lesiones en estadios precoces (I y II) son potencialmente curables con cirugía o radioterapia, consiguiéndose una supervivencia del 80-90% a los 5 años (32). Si las lesiones están en estadios avanzados (III y IV) son generalmente tratadas con cirugía seguida de radioterapia y quimioterapia (aunque el papel de la quimioterapia en el cáncer oral todavía no está claramente definido), alcanzando una supervivencia a los 5 años del 34-54% (32).

Los resultados de la terapia estándar, incluso cuando se emplean la cirugía radical y varias formas de radio y quimioterapia, han permanecido en niveles decepcionantes pese al avance de los tratamientos multidisciplinarios (90,91). Una de las razones es que la piedra angular de las decisiones terapéuticas, el sistema de clasificación TNM, complementada con el estadio del grado de diferenciación histológica, ha demostrado que no siempre es un indicador pronóstico satisfactorio (92,93). Por lo tanto, hay una gran necesidad de investigar nuevos indicadores pronósticos, volcados principalmente en la valoración de la agresividad biológica de las lesiones propias de cada paciente.

La cirugía implica la resección completa de la lesión con un margen de tejido normal adyacente y, cuando está indicado, algunos o todos los ganglios linfáticos cervicales homolaterales y en algunas ocasiones los contralaterales (94).

La radioterapia posee la ventaja de preservación de los órganos y actualmente es la modalidad de tratamiento primaria de algunos casos de carcinomas de lengua, amígdala palatina, paladar blando y faringe. Sin embargo, el tratamiento no está libre de reacciones adversas y es frecuente la aparición de mucositis, xerostomía, candidiasis y, en algunos casos, osteorradionecrosis. Según Rades et al., la IMRT (intensidad modulada de radioterapia) produce menos xerostomía que las técnicas convencionales (95).

La decisión de emplear o no la radioterapia postoperatoria, debe considerar tanto la lesión primaria como la extensión regional de la enfermedad. Cuando los factores relacionados con el tumor primario (lesiones primarias extensas, márgenes quirúrgicos positivos, invasión de los espacios perineural, linfático y vascular) indican el uso de la radioterapia, el cuello debe ser incluido en el campo de tratamiento (86).

Cuando la radioterapia se combina con la cirugía, parece haber una preferencia por la radioterapia postoperatoria, puesto que ésta induce una fibrosis tisular (lo que haría la cirugía más difícil). Además, los tejidos irradiados poseen una capacidad de cicatrización más lenta (96).

El uso de la quimioterapia, en general a través de la combinación de diversas drogas citotóxicas, no ha tenido particular éxito en el tratamiento del COCE y se considera más una modalidad de tratamiento paliativo que un tratamiento curativo primario. Los principales agentes utilizados han sido el metotrexato, la bleomicina, el cisplatino y el 5-fluoracilo. La quimioterapia puede dar como resultado una disminución temporal del tamaño de la masa tumoral, pero no ha demostrado un aumento significativo en las tasas de supervivencia a los 5 años, control del tumor primario y reducción del potencial metastásico (97). Sin embargo, ensayos clínicos más recientes, utilizando la combinación de la quimio y radioterapia en el tratamiento de pacientes con lesiones en estadios avanzados, han demostrado resultados preliminares alentadores y deben tener su papel en el futuro (98). Por ahora, su indicación en el tratamiento del COCE se limita a tumores en estadios avanzados que debido a su extensión o a las recidivas y metástasis tumorales, sean considerados como inoperables (99).

Existen otras variedades de tratamiento como la hormonoterapia, vacunas oncológicas (polisacáridos, peptídicas, anti-idiotipos, ADN recombinante) (100), terapia antiangiogénica (101), etc, aunque sus aplicaciones son todavía muy limitadas en el COCE.

II. 2. BASES GENÉTICAS Y MOLECULARES DEL CÁNCER ORAL

El proceso carcinogénico incluye varias fases estrictamente necesarias para el desarrollo final de la neoplasia. En cada una de estas fases aparecen implicados múltiples genes. Para que la comprensión del proceso carcinogénico sea más claro, vamos a dividirlo en una serie de fases virtuales, puesto que los procesos de cancerización no son independientes uno del otro y son resultado de un complejo proceso de alteraciones genéticas en múltiples etapas de manera repetida e interconectada. Hanahan y Weinberg describieron 6 características distintivas que se repiten en todos los tumores y que denominaron “*Hallmarks of cancer*” (4):

- i) **Adquisición de señales estimuladoras del crecimiento autosuficientes:** factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), factor de crecimiento hepatocítico (*c-Met*), oncogen *ras*, ciclina D1, proteínas STAT, factor nuclear kappa B (*NF-κβ*), proteína activadora 1 (*AP-1*).
- ii) **Anormalidades en las señales inhibitoras del crecimiento:** gen del retinoblastoma (*Rb*), *p53*, *p21^{WAF1}*, *p16^{INK4a}*.
- iii) **Evasión de la apoptosis.**
- iv) **Inmortalización.**
- v) **Angiogénesis:** factor de crecimiento vascular endotelial (*VEGF*), interleukina-8 (*IL-8*).
- vi) **Invasión y metástasis:** E-cadherina, integrinas, metaloproteinasas de la matriz (*MMP*).

II.2.1. CICLO CELULAR

El ciclo celular consiste en una serie de fases, durante las cuales ocurren cambios que conllevan a la división celular. El ciclo celular consiste en una fase estacionaria G0 (Gap 0), que con la recepción de señales celulares adecuadas, es seguido por las fases G1, S, G2 y finalmente la mitosis (M) (102) (Figura 2).

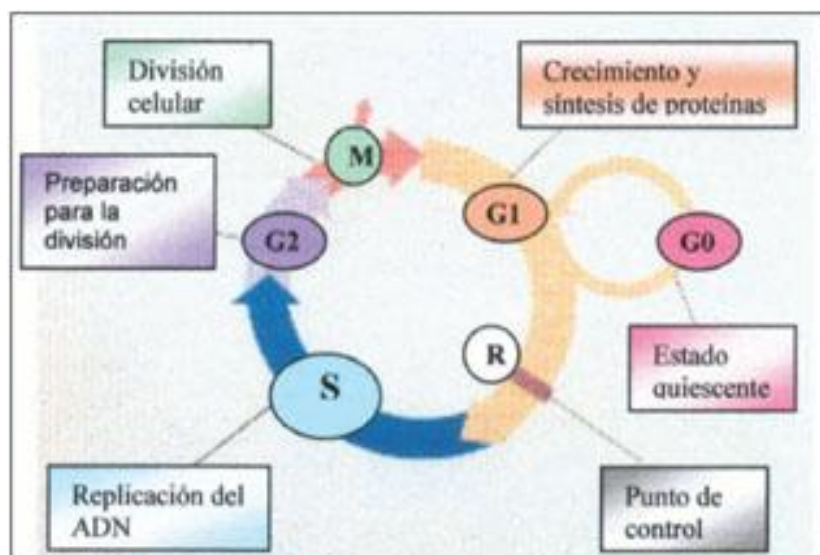


Figura 2. Fases del ciclo celular. Modificada Bascones (103).

La fase G0 o fase de quiescencia, es la situación en la que se encuentran la mayor parte de las células del organismo. En esta fase no se detecta actividad de síntesis proteica y la célula no forma parte del ciclo celular, pero tras un estímulo adecuado, es susceptible a reincorporarse en él. La duración de esta fase es variable (102,104).

Durante la fase G1 tiene lugar la síntesis de ARN y proteínas, pero no hay replicación de ADN. Es la fase de mayor duración del ciclo y también es variable. A esta fase se incorporan las células que han estado en la fase G0 (104).

En la fase S o de síntesis tiene lugar la formación de ADN y la duplicación del genoma humano. Se inicia con la formación de ADN y termina cuando el contenido de ADN del núcleo se ha duplicado y cada cromosoma ha dado lugar a dos cromátidas idénticas. Es decir, durante la fase S, el contenido de ADN aumenta desde un estado diploide $2n$, hasta el valor de replicación $4n$. Dura entre siete y doce horas (104).

La fase G2 es el periodo comprendido desde el final de la fase S hasta la mitosis. Es una fase de aparente inactividad, durante la cual la célula tiene dos juegos diploides completos de cromosomas. Dura entre una y seis horas (104).

En la fase M o fase de mitosis se produce la segregación de los cromosomas dando lugar a la división de las cromátidas hermanas y tiene lugar tanto la división nuclear

(mitosis) como la división del citoplasma (citocinesis). Dura entre una y dos horas (104).

La transición de una fase del ciclo celular a la siguiente, es controlada en “puntos de control o restricción”, antes de que el ciclo pueda progresar. Cuando existe un daño del ADN, los genes que controlan estos puntos de restricción, detienen el ciclo celular para facilitar la reparación del ADN (105). La detención en la fase G1, previene la replicación del ADN dañado y la detención en la fase G2 permite la segmentación de los cromosomas dañados. Todas estas rutas, convergen en un complejo aparato molecular presente en el núcleo, denominado *reloj del ciclo celular*. Dicho reloj se descontrola en prácticamente todos los tipos de cánceres humanos (102,104).

La progresión del ciclo celular requiere la actuación coordinada de una compleja red de proteínas reguladoras que son las ciclinas y las quinasas ciclina-dependientes (CDKs). Hay cuatro clases de ciclinas, según el estadio del ciclo celular en el que actúan y a la CDK a la que se unen. De ese modo, cada uno de los distintos complejos ciclinas-CDKs sirve como un interruptor molecular que dispara un suceso específico en el ciclo celular (106).

En condiciones normales, la división de los queratinocitos orales es estimulada por los factores de crecimiento epidérmicos (*EGF*) al unirse con sus receptores de factores de crecimiento epidérmicos (*EGFR*), localizados en la membrana celular de los queratinocitos de la capa basal. La unión entre ligando y receptor activa la proteína *raf* y posteriormente da inicio a un proceso en cascada de activación de otras quinasas citoplasmáticas (*MEK* y *MAPK*) (107).

Esta cascada de activación de las quinasas, transmite la señal externa de crecimiento desde la membrana celular hacia el núcleo, donde los niveles de quinasas aumentan bruscamente. La proteína *c-myc* se une al ADN y estimula la transcripción de la ciclina D, que se une y activa las *CDKs*. Las *CDKs* activadas catalizan la fosforilación de la proteína supresora de tumores del gen del retinoblastoma (*pRb*). La *pRb* fosforilada (activa) libera los factores de transcripción (E2F) que son necesarios para la transcripción de proteínas de replicación del ADN. La replicación de ADN antecede a la división celular (107).

Las ciclinas D y la mayoría de las proteínas de replicación del ADN se degradan, necesitando ser transcritas nuevamente en cada ciclo de división celular. La mayoría de estas proteínas que transmiten la señal de crecimiento a partir de la membrana hacia el núcleo, son codificadas por oncogenes. Mutaciones en estos oncogenes pueden estimular la proliferación excesiva de los queratinocitos en el cáncer oral (108).

La patogénesis del cáncer oral depende de la adquisición de seis habilidades fundamentales por parte de las células neoplásicas: 1) autosuficiencia de las señales de crecimiento, 2) insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento, 3) evasión de la muerte celular programada (apoptosis), 4) potencial replicativo ilimitado, 5) mantenimiento de la angiogénesis y 6) capacidad de invadir los tejidos y producir metástasis (109).

Estos comportamientos no son independientes uno del otro y son resultado de un complejo proceso de alteraciones genéticas en múltiples etapas.

II.2.2. ONCOGENES

En el estudio del cáncer se han establecido algunas premisas, como que las células cancerosas derivan de una sola célula que ha acumulado mutaciones a lo largo del tiempo (110). Se ha concluido también que las células de los organismos multicelulares están en reposo en ausencia de estímulos y que las mutaciones ocurren en genes que controlan la proliferación y/o el ciclo celular. Esto ha llevado a que los investigadores busquen las causas del cáncer “dentro” de la célula y en especial, mutaciones en los llamados oncogenes y genes supresores de tumores (111).

Los protooncogenes son genes normales que afectan a la proliferación y la diferenciación celular, pudiendo convertirse en oncogenes a través de mutaciones puntuales, deleciones, translocaciones o amplificación genética (112). Los oncogenes son genes cuyos productos se asocian a la transformación neoplásica a través de la producción de proteínas que regulan el ciclo celular. Según la función de sus productos proteicos, los oncogenes se pueden dividir en: factores de crecimiento, receptores transmembrana, mensajeros citoplasmáticos y factores nucleares de transcripción (112).

Los oncogenes fueron clasificados por Sidransky en 1995 en 5 grupos (113):

- i) Factores de crecimiento y receptores de los mismos: *hst-1*, *int-2*, *EGFR/erbB*, *c-erbB-2/Her-2*, *sis*.
- ii) Transductores de señales intracelulares: *ras*, *raf*, *stat-3*.
- iii) Factores de transcripción: *myc*, *fos*, *jun*, *c-myc*.
- iv) Reguladores del ciclo celular: *ciclina D1*
- v) Inhibidores de la apoptosis: *bcl-2*, *bax*.

Aunque existe controversia en la literatura, diversos oncogenes han sido asociados a la carcinogénesis oral. Se cree, que la expresión aberrante de los oncogenes: receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR/c-erb 1*), *CCND1/ciclina D1* (114) y miembros de la familia *ras*, *c-myc*, *int-2*, *hst-1*, *PRAD-q* y *bcl-1* contribuyen al desarrollo del cáncer oral (115).

Los oncogenes codifican muchas de las proteínas transmisoras de señales, por las cuales, las células responden a señales de crecimiento externos. Las células normales, con oncogenes normales, no dan inicio al proceso de replicación del ADN y división celular sin el estímulo de señales externas. Sin embargo, cuando existen mutaciones en los oncogenes, las oncoproteínas mutadas pueden enviar un estímulo de crecimiento desde el citoplasma hacia el núcleo, mismo en ausencia de señalización externa. De esta manera, la proliferación autógena de las células que poseen oncogenes mutados da como resultado la aparición de tumores. La señalización celular es esencial para dar paso a los mensajes desde la membrana plasmática hasta el núcleo celular (116).

II.2.3. GENES SUPRESORES DE TUMORES

El concepto de los genes supresores de tumores (GST), proviene de experimentos genéticos en células somáticas, donde la hibridación entre células cancerosas y células normales, fue no tumorogénica, lo que sugiere que la presencia de uno o varios genes de las células normales eran dominantes y capaces de suprimir el potencial tumorogénico de las células cancerosas (117).

Los genes supresores tumorales están implicados en diversos procesos de división celular: la regulación de la expresión génica, el control del ciclo celular, la

programación de la muerte celular y la estabilidad del genoma. La pérdida de actividad de estos genes, provoca la incapacidad de respuesta a los mecanismos de control que regulan la división celular; de modo que se produce una proliferación más o menos incontrolada de la célula, lo cual conduce, en ocasiones, al desarrollo de neoplasias y a la evolución de las mismas hacia procesos tumorales más agresivos (118).

A diferencia de los oncogenes, que pueden ser afectados a través de mutaciones de solamente una de las dos copias de los genes, los genes supresores de tumores son inactivados por mutaciones puntuales, reordenaciones o deleciones en las dos copias de los genes, por lo tanto se comportan como genes recesivos desde el punto de vista de su expresión, así, la alteración exclusiva de un solo alelo no tiene consecuencia alguna (119). Aunque con un número reducido, los genes supresores de tumores juegan un papel fundamental en el proceso de la carcinogénesis.

Existen dos grupos fundamentales de genes supresores de tumores, los llamados “*gatekeepers*”, que controlan las vías de proliferación celular. Típicamente, los “*gatekeepers*” son reguladores negativos del ciclo celular. El segundo grupo, los llamados “*caretakers*”, controlan la precisión del proceso de división celular. Usualmente, estos genes están involucrados en la reparación del ADN y en el control de la estabilidad genética. Su inactivación no da lugar a la proliferación celular *per se*, pero permite la adquisición rápida de otras alteraciones genéticas (120).

La inactivación de los genes supresores de tumores se puede dar a través de pérdida de heterocigosidad, deleciones o inserciones, silenciamiento transcripcional por alteración en la región promotora, o mutaciones puntuales (115).

Gen Rb

El gen del retinoblastoma es el primer gen supresor de tumores conocido. Produce la *pRB* que actúa como un freno al progreso de la célula desde la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Cuando la célula recibe el estímulo de los factores de crecimiento, la proteína Rb se inactiva, por lo que el freno desaparece y la célula atraviesa el punto de control G1-S. Si falta la *pRb* o si una mutación altera su capacidad, el freno molecular

del ciclo celular desaparecerá y la célula avanzará despreocupadamente hacia la fase S (49).

La ciclina D1 es una proteína inestable, fundamental para la progresión de G1 mediante la activación del complejo *CDK4/6* que lleva a la fosforilación de la proteína *pRB*. La fosforilación de la proteína *pRB*, es esencial para la continuación del ciclo celular. Si *pRB* no está fosforilada se bloquea el ciclo celular. *pRb* fosforilada, libera un factor de transcripción que induce la activación de los genes que regulan la síntesis de ciclina E y ciclina A:

— La síntesis de ciclina E comienza en la fase G1 tardía. Esta ciclina se une a la *CDK2*, formando un complejo activo que induce la síntesis de las enzimas y proteínas necesarias para la producción de ADN.

— La ciclina A tiene la misión de activar a la *CDK1* durante la fase S. El complejo *ciclina A/CDK1* promueve, durante la fase G2, la síntesis de las proteínas implicadas en la mitosis. Estas proteínas conducen finalmente a la división de la célula en la fase M.

Se ha encontrado sobreexpresión de *ciclina D* en carcinomas orales (121).

Las CDK también son reguladas por los llamados inhibidores de las CDK (CKI), de los cuales encontramos dos familias en mamíferos: la familia de *p21* (*p21*, *p27*, *p57*) y la familia *INK4* (*p15*, *p16*, *p18*, *p19*) (102).

La *p16^{INK4a}* se une al complejo *CDK4/CDK6* impidiendo su asociación con la *ciclina D1* dando como resultado la detención del ciclo celular en G1 mediante la no fosforilación de *pRB* (122,123).

El *CKI p27* comparte secuencias homólogas con *p21^{WAF1}* y actúa como un regulador negativo del ciclo celular, implicado en la detención en la fase G1, mediante un mecanismo independiente de *p53* (123).

Gen *p53*

La mutación del gen supresor de tumor *p53*, es uno de los cambios genómicos más frecuentes y más investigados en el cáncer humano. El gen *p53* se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (124). Este gen, en condiciones de normalidad, codifica una

fosfoproteína nuclear (proteína natural o salvaje), que actúa como un regulador negativo de la proliferación celular mediante una acción compleja, puesto que al mismo tiempo actúa como factor de transcripción, interruptor del ciclo celular e inductor de apoptosis. Cuando ocurren mutaciones en *p53*, se produce una síntesis anormal de proteína, proteína *p53* mutada, que tiende a estabilizarse y acumularse en el núcleo. Esta proteína mutada pierde su capacidad supresora del crecimiento celular. La regulación negativa del *p53* sobre la replicación ocurre ante diferentes tipos de agresiones en el ADN, aumentando entonces la cantidad de proteína nuclear *p53*. La consecuencia inmediata del incremento de *p53* es la detención del ciclo celular en G1 (102).

Si la reparación del ADN es satisfactoria, *p53* activará a un gen denominado *mdm2*, cuyo producto se une e inhibe a la propia *p53*, levantando así el bloqueo celular. Si las alteraciones del ADN son muy extensas y el daño no puede ser reparado, la proteína *p53* puede inducir el inicio de muerte celular fisiológica (apoptosis). De esta forma, la proteína salvaje *p53* actúa como un verdadero guardián de la integridad del genoma, estableciendo la posibilidad de que las células dañadas reparen su ADN, previniendo la inestabilidad genómica (125).

La *p53* bloquea el ciclo celular mediante la inducción de la proteína *p21*, inhibidora de las CDK. La *p21*, bloquea la transición G1-S y bloquea también directamente la replicación del ADN en la fase S del ciclo celular, mediante la inhibición de la actividad de la proteína PCNA sobre la ADN polimerasa *d27*. También se ha visto como la *p21* puede actuar por otro mecanismo independiente de la *p53* (122,126).

El gen *p53* bloquea también la angiogénesis, posible favorecedora del desarrollo y la diseminación tumoral, a través de la secreción de trombospondina-1 (*TSP-1*) por parte de los fibroblastos; de esta forma, en las células transformadas, la ausencia de *p53* favorecería la inducción de la angiogénesis mediante una disminución de la secreción de *TSP-1* (127).

Gen *p73*

En condiciones adecuadas, de igual manera que el gen *p53*, puede detener el ciclo celular y provocar la apoptosis (128).

Genes BRCA-1 Y BRCA-2

Son 2 genes supresores del cáncer. Ni el *BRCA-1* ni el *BRCA-2* se encuentran inactivados en la mayoría de los COCE, por lo que se cree, que existen nuevos genes supresores tumorales implicados (129).

FHIT (triada histidina-frágil)

FHIT que ha aparecido recientemente alterado en algunas líneas celulares de carcinomas de cabeza y cuello, aunque todavía no está muy claro este papel y se necesitan más estudios para corroborarlo (102). Sin embargo, Heerden et al., afirman que la presencia de la proteína FHIT se reduce entre un 66-71 % en el COCE (130,131).

II.2.4. MECANISMOS EPIGENÉTICOS

Además de por la activación de protooncogenes y la inhibición de GST, La proliferación también puede ser mediada por los llamados mecanismos epigenéticos, dónde la falta de regulación no es causada por mutaciones en oncogenes o genes supresores sino por alteraciones en otros elementos que indirectamente afectan la función de las proteínas reguladoras (49).

Este es el caso de la pérdida de la neurofibromina (producto del gen *NF-1*) en la neurofibromatosis, donde se describe la aparición de schwannomas malignos, producto de la ausencia de esta proteína implicada en las vías de regulación negativa de la transducción de señales proliferativas (30).

Otro mecanismo epigenético es el causado por proteínas virales, como la neutralización de la *p53* y la *pRB* por oncoproteínas virales *E7* y *E8* de los papiloma virus tipo 16 y 18, causales del cáncer de cuello uterino (30).

También *Helicobacter pylori* puede provocar linfoma gástrico de bajo grado (tipo MALT) sin mutación alguna (30).

II.2.5. PROLIFERACIÓN CELULAR

La proliferación celular se puede definir como “el aumento del número de células resultante de la conclusión del ciclo celular” (132). La proliferación excesiva puede producirse de dos formas fundamentales: ya sea aumentando o estimulando los factores proliferativos, con la activación de protooncogenes, disminuyendo o bloqueando los factores inhibitorios, con la inactivación de genes supresores. Ambos fenómenos pueden estar presentes en el cáncer (133).

La tasa de proliferación de un cáncer depende de distintos factores, tales como la proporción de células que proliferan (fracción de proliferación), la duración del ciclo celular y el factor de la pérdida celular (debido a la muerte y a la diferenciación celular). El estudio de la fracción de proliferación tiene gran importancia, ya que no deja de ser el reflejo del comportamiento del cáncer, cuanto mayor sea la fracción de proliferación, mayor será el crecimiento del tumor (49).

La hiperproliferación es un marcador precoz, aunque no específico, de un desorden en el crecimiento. Se acepta generalmente que un aumento en la proliferación se asocia con lesiones en estadios más avanzados y que la distribución de las células proliferativas en el tejido, puede darnos más información acerca del mecanismo de regulación que pierde su funcionalidad durante el proceso de la carcinogénesis (64).

Se han desarrollado distintos métodos para la detección de la tasa de proliferación celular. Estos métodos difieren no solamente en lo que detectan, sino también en la fase del ciclo celular que marcan. Estos métodos incluyen la cuantificación de figuras mitóticas, el marcaje de la fase S mediante timidina tritiada o de su análogo bromodeoxiuridina (BrdU) y, más recientemente, la citometría de flujo y la inmunohistoquímica. Los dos marcadores más comúnmente utilizados son el *PCNA* y el *Ki-67/MIB-1* (134).

II.2.6. APOPTOSIS Y ENVEJECIMIENTO CELULAR

APOPTOSIS

Apoptosis es un término introducido en 1980 por Wyllie Kerry Curri y representa la muerte celular programada. Es un vocablo griego que significa la caída de las hojas de un árbol o de los pétalos de una flor. Difiere de la necrosis en dos aspectos fundamentales: 1) es un proceso activo que requiere de síntesis proteica y consumo de energía y 2) es un mecanismo fisiológico inherente al desarrollo celular. Se regula genéticamente y constituye un mecanismo fisiológico utilizado por el organismo para producir a conveniencia células muertas (135). El proceso de apoptosis tarda aproximadamente 30 minutos. Los fenómenos que se producen son: la rotura del citoesqueleto y las organelas, el encogimiento celular, brote de yemas en la membrana celular, condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos que son fagocitados por los macrófagos o las células vecinas (102).

Aunque este mecanismo de autodestrucción se activa en respuesta a una diversidad de circunstancias, el proceso de apoptosis sigue los mismos pasos independientemente de cual haya sido la circunstancia determinante. Primero se produce la fragmentación del ADN cromosómico, la desorganización estructural de los orgánulos y la pérdida de la morfología normal de las células (las células apoptóticas se vuelven esféricas). Luego, las células se descomponen en fragmentos celulares pequeños denominados cuerpos apoptóticos que son fagocitados por los macrófagos (136).

Existen dos vías apoptóticas fundamentales:

1) La *extrínseca* mediada por receptores de superficie de membrana como el de citocinas *Fas-L* y el resto de la familia de los factores de necrosis tumoral (*TNF*). La unión del *TNF- α* al receptor *Fas* (miembro de la familia de los receptores del *TNF*) conduce al reclutamiento de la forma zimógena de la caspasa-8 para formar un complejo llamado "complejo de inducción de la señal de muerte" (DISC). DISC activa la caspasa-8 comenzando la cadena de proteólisis de las caspasas 3, 6, 7 y terminando en la apoptosis. Por otro lado la activación de *Fas* hace que la caspasa-8 provoque la escisión de *Bid* en *t* y *c-Bid*, lo que inducirá cambios apoptogénicos mitocondriales (102).

2) La *intrínseca*, está mediada por las mitocondrias que liberan citocromo c, flavoproteínas inductoras de la apoptosis, activadores de las proteasas cisteína-aspartato o caspasas (enzimas que inician la autodestrucción celular), factor inductor de la apoptosis (AIF), ATP, proteínas del shock calórico y Diablo/Smac (135).

El citocromo c junto con el ATP y el factor activador de la proteasa apoptótica (*Apaf-1*) forman un complejo llamado apoptosoma, que regula la activación de la caspasa-9 que a su vez activará como en el mecanismo extrínseco a las caspasas 3, 6 y 7 (102).

Junto con este complejo mecanismo de activación apoptótica hay que reseñar la existencia de moléculas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) que son: *NIAP*, *CIAP1*, *CIAP2* y la proteína apoptótica inhibidora del cromosoma X (*XIAP*) (102).

Las vías apoptóticas se regulan por medio de los productos de determinados genes que rigen el destino de la célula. Estos genes pueden sufrir mutaciones y originar desequilibrio en los mecanismos de muerte celular programada.

Existe una gran familia de genes cuyos productos participan de alguna manera en la muerte celular programada. Los genes que estimulan la apoptosis actúan como genes supresores o antioncogenes, mientras que aquellos que la inhiben se consideran protooncogenes (116).

La familia de genes *Bcl-2*, codifica inhibidores de la apoptosis. La sobreexpresión de *bcl-2*, producto bloqueador de la apoptosis, es resultado de la translocación t (14,18) (q32,q21) en los linfomas foliculares y en la leucemia linfática crónica, que convierte a los linfocitos en “inmortales” y su acumulación excesiva genera la enfermedad.

Sin embargo, puede ocurrir lo contrario, un bloqueo de los inductores de la apoptosis, que sucede con la supresión de la función de genes como el *bax*, *bag* y el *p53* (135).

Un gen supresor de tumor que ha llamado la atención en los últimos años por su participación en la apoptosis es el *p53* y cuando muta en tumores humanos (pulmón, mama, colon y vejiga entre otros), la célula maligna adquiere un comportamiento biológico particularmente agresivo.

El *p53* normal se expresa cuando la célula es dañada por sustancias químicas mutágenas o radiación, frenando a la célula en la fase presintética del ciclo (G1) para dar tiempo a la acción de los mecanismos reparadores del ADN e induce la transcripción de enzimas

reparadoras del ácido desoxirribonucleico. En la célula mutada, si el daño no es reparado, *p53* induce la apoptosis incrementando la transcripción del gen *bax*. Si el *p53* no funciona la célula mutada no muere y continúa dividiéndose y las células hijas nuevas siguen adquiriendo mutaciones que les proporcionan nuevos atributos de malignidad (64,111).

Desde hace poco tiempo, un nuevo gen llamado *survivin* que codifica la proteína survivina (que es una IAP), que se sitúa en la interfase entre la apoptosis y la proliferación, se ha expresado en la mayoría de los cánceres humanos y no en los tejidos normales. Parece que la sobreexpresión de este gen, está relacionada con un peor pronóstico del cáncer. El estudio de esta molécula podría revelar nuevas vías de control en el origen de las neoplasias (138).

El factor de transcripción *E2F1* se involucra tanto en el ciclo celular como en la apoptosis, dos procesos que parecen estar íntimamente relacionados. Este podría ser el punto en que, en función de la disponibilidad de estímulos procedentes de las cascadas de señales, se decide el destino de la célula (135).

Otros genes reguladores de la apoptosis serían: *bax*, *bad* y *bcl-xs*, que favorecen la muerte celular programada (139).

En resumen, las mutaciones en los genes involucrados en la muerte celular programada, provocan la immortalización y permiten que la célula se divida indefinidamente a pesar de las continuas mutaciones que se transmiten de generación en generación, lo que origina la enfermedad neoproliferativa.

ENVEJECIMIENTO CELULAR

El envejecimiento celular es un proceso ligado a la apoptosis. Todo lo que envejece de forma continua culmina con la muerte. Cuando una célula es capaz de tener una cantidad infinita de replicaciones sin afectar su esperanza de vida, es decir sin desencadenar la apoptosis, se le llama inmortal. Esto es bastante común en el cáncer. Así, Campo-Trapero et al., definen la apoptosis como un sistema de defensa de

emergencia de las células que están en camino de convertirse en cancerosas, una respuesta ante el estímulo de un oncogén. Se trataría pues de un freno a la progresión de las lesiones cancerizables, condenando a esas células a una “cadena perpetua celular” (140).

Las células humanas tienen un reloj, llamado telómero (producido por telómeras), y se localiza en el extremo del cromosoma. Las puntas del cromosoma no se replican y en cada división celular se pierde un segmento, acortándose progresivamente. Este fenómeno es la traducción molecular de la senescencia o envejecimiento celular. Cuando el telómero llega a un tamaño crítico se dispara el mecanismo de la apoptosis al detenerse el ciclo celular (141).

En las bacterias los cromosomas son circulares y la ausencia de extremos y telómeros les permite ser inmortales. El embrión del mamífero, resuelve su problema expresando las telomerasas que regeneran constantemente los telómeros, por lo cual la célula del embrión no envejece. En el adulto esta enzima no se activa en algunos tejidos como las células germinales, células madre de la médula ósea, piel y aparato gastrointestinal; sin embargo, en el cáncer alrededor del 90% de las células logran expresar telomerasa y el resto utilizan otros mecanismos para preservar los telómeros.

Esto explica la capacidad de la célula cancerosa de dividirse indiscriminadamente sin envejecer, consiguiendo la inmortalización (4,109).

Otro trastorno en el mecanismo normal de envejecimiento, se produce cuando existen oncoproteínas virales o mutaciones en los genes inductores de la senescencia. En este caso la célula no obedece al tamaño crítico del telómero y en vez de que se produzca apoptosis, continúa dividiéndose y el telómero se erosiona, hasta un nuevo bloqueo de la división celular, que se produce con un telómero extremadamente corto, lo que se denomina “*crisis de cromosomas*”. Las divisiones que la crisis produce, hacen que los cromosomas sean propensos a rotura y fusión de material genético con reordenamiento de genes, lo que genera todo tipo de mutaciones. Algunos autores sugieren que la afectación de la función de los telómeros, una vez que la célula franquea la “*crisis de cromosomas*”, es el paso inicial en la carcinogénesis y factor de la cascada de mutaciones, que de manera escalonada experimentan las células durante la transformación neoplásica (30).

Hoy día, se ha logrado immortalizar células humanas mediante la transfección del gen de la telomerasa. El uso de inhibidores de las telomerasas podría ser un perfil de tratamiento biológico del cáncer, pero hay que tener en cuenta las posibles reacciones secundarias sobre los tejidos normales que en el adulto expresan esta proteína (30).

II.2.7. REPARACIÓN DEL ADN E INMORTALIZACIÓN

La exposición del ADN a agentes carcinógenos puede ser dañino y se manifiesta en mutaciones que son habitualmente reparadas por enzimas pertenecientes a sistemas biológicos intrínsecos de la célula. Cuando los mecanismos fallan las mutaciones persisten y se transmiten a las células hijas, lo que origina diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer (104).

Gracias a la disección molecular de algunas neoplasias, se ha logrado identificar genes responsables de la reparación del ADN y de mantener la estabilidad genómica. Las mutaciones son el origen de condiciones que predisponen al cáncer. Revelar los genes implicados en trastornos de la reparación del ADN ha sido difícil; la determinación de sus funciones fisiológicas normales, así como su papel específico en la oncogénesis, ha resultado complicado (120).

Existe evidencia clínica y experimental que prueba el comportamiento de estos genes como supresores o antioncogenes, cuyas mutaciones pueden ser hereditarias. Este es el caso del xeroderma pigmentosa, donde el individuo padece, desde etapas tempranas de la vida cánceres múltiples en la piel, debido a la incapacidad para reparar el daño producido en el ADN por las radiaciones ultravioletas de los rayos solares, como resultado de la transmisión hereditaria de una copia defectuosa de los genes implicados en la reparación del ADN (30).

La afectación de los genes *XPA* y *XPB*, es responsable de la acumulación temprana de mutaciones en las células de la piel de los individuos con xeroderma pigmentosa, aunque también se han visto tumores en órganos internos, en el modelo animal con *XPA* mutante. Recientemente, se ha observado la relación de los genes reparadores de ADN *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3* y *XRCC4* con el cáncer oral (142).

Otros tumores del colon con carácter hereditario, poseen copias defectuosas de genes reparadores. Este es el caso de los genes *MLH1*, *MSH2* y *MSH6*, responsables del cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (síndrome con transmisión autosómico dominante con alta penetrancia) y el *BRCA-1* y 2, que predisponen al cáncer de mama (135).

La capacidad de reparar lesiones en el material genético es diferente en cada individuo, lo que hace a unos más susceptibles al cáncer que a otros. La eficacia de este sistema es una de las razones por las cuales el cáncer no aparece en etapas tempranas de la vida y tienen que pasar varias décadas para que la acumulación de mutaciones logre generar un tumor en los tejidos expuestos a carcinógenos. El conocimiento profundo de estos sistemas de reparación puede servir para establecer pautas potenciales en la prevención del cáncer (135).

II.2.8. ANGIOGÉNESIS

La capacidad de un tumor para inducir la proliferación de vasos sanguíneos en el huésped, tiene un efecto importante en el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis. La actividad angiogénica promueve la expansión rápida de las células tumorales e incrementa el riesgo de metástasis. La observación de que el crecimiento tumoral depende de la inducción de neovascularización, se originó a principios de 1960, cuando las células tumorales eran inoculadas dentro de órganos perfundidos aislados y la ausencia completa de angiogénesis fue asociada con la restricción del crecimiento, con tumores pequeños (menores de 1 mm). Cuando el tumor era transferido al ratón de origen, éste comenzaba a neovascularizarse y crecía más de mil veces que en el órgano aislado (143).

La hipótesis de que el crecimiento tumoral es dependiente de angiogénesis, es consistente con la observación de que la angiogénesis es necesaria, pero no suficiente para continuar el crecimiento tumoral. Aunque la ausencia de angiogénesis puede limitar el crecimiento tumoral, la instalación de ésta en un tumor permite, pero no garantiza, la expansión tumoral (117).

La angiogénesis se produce principalmente en respuesta a factores angiogénicos liberados por los tejidos isquémicos, tejidos que crecen rápidamente o tejidos con tasas

metabólicas excesivas. El proceso consta de múltiples pasos que parecen estar regulados tanto por factores estimulantes como por factores inhibidores (49).

Los factores reguladores positivos (FRP) son aquellos que cuando se manifiestan, se produce un cambio fenotípico hacia la angiogénesis. Los FRP son los siguientes: factor de crecimiento fibroblástico a y b (*aFGF*, *bFGF*), angiogenina, *TGF α* , *TGF β* , *TNF α* , *VEGF*, *PDGF*, *CSF*, *PGF*, *IL8* y *HG*.

El *bFGF* es un fuerte mitógeno y quimiotáctico para células vasculares. La expresión de *VPF/VEGF* y de sus receptores es regulada por la presencia de hipoxia en la fase vascular del crecimiento tumoral lo que puede explicar los períodos cíclicos de la angiogénesis. El RNAm del *VPF/VEGF* es inducido en las células epiteliales y los fibroblastos por el factor de crecimiento transformante β (*TGT- β*), lo que explica que la acción angiogénica del *TGT- β* , es mediada en gran parte por el *VEGF* (117).

Los factores reguladores negativos (FRN), defienden al endotelio vascular de la estimulación. Algunos de los mecanismos para la inhibición de angiogénesis son: oligosacáridos específicos de bajo peso molecular, derivados del heparán-sulfato, el contacto cercano con otra célula y la liberación de interferón β (*INF- β*) por fibroblastos en algunos tejidos. Entre otros se encuentran el interferón α (*INF- α*), factor derivado de plaquetas, trombospondina, inhibidores tisulares de metaloproteinasas, un fragmento de 16 kDa, tetrahydrocortisol y algunos otros metabolitos del cortisol(117).

Macluskey et al., demostraron la reducción estadísticamente significativa de trombospondina-1 en muestras de cáncer oral en relación al grupo control; esta reducción parece estar clínicamente relacionada con los fenómenos de angiogénesis que se producen en las neoplasias malignas (144).

Los factores angiogénicos mejor caracterizados son el factor de crecimiento de células endoteliales (*EGF*), el factor de crecimiento fibroblástico (*FGF*) y la angiogenina. Para que un tumor crezca, tiene que liberar más factores estimulantes que factores inhibidores en el tejido circundante (109).

El factor de crecimiento vascular endotelial (*VEGF*) induce la proliferación, diferenciación y migración de las células vasculares endoteliales, aumenta la permeabilidad de los vasos capilares y también aumenta la supervivencia de las células

endoteliales previniendo la apoptosis (4). Algunos estudios han demostrado que la expresión de *VEGF*, es un factor pronóstico independiente en pacientes con cáncer de mama, colon y esófago (145-147)

Los factores asociados con la angiogénesis en el COCE han sido utilizados como dianas terapéuticas en nuevas modalidades de tratamiento del cáncer oral. Los tumores sólidos, no pueden crecer entre 1 y 2 mm en diámetro sin inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos que les faciliten el aporte de nutrientes necesarios. El bloqueo del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, priva al tumor de nutrientes y oxígeno, y por lo tanto, inhibiría el crecimiento del tumor y su diseminación a otras zonas del organismo.

Actualmente existen distintas estrategias anti-angiogénesis siendo investigadas en ensayos clínicos: 1) bloqueo de la habilidad de las células endoteliales en romper la matriz extracelular adyacente, utilizando inhibidores de las metaloproteinasas (*MMPs*); 2) inhibición directa del crecimiento de las células endoteliales; 3) bloqueo de los factores que estimulan la angiogénesis, por ejemplo el bloqueo de la señal del factor de crecimiento vascular endotelial (*VEGF*) y 4) bloqueo de las integrinas, moléculas de la superficie de las células epiteliales que garantizan la supervivencia de las células endoteliales y promueven la angiogénesis (148).

II.2.9. INVASIÓN Y METÁSTASIS

El COCE se caracteriza por su alto grado de invasividad local, así como por su alta tendencia a producir metástasis a los ganglios linfáticos cervicales y consecuentemente, altas tasas de recidiva local y regional (149).

El mecanismo de invasión y metástasis es complejo y consiste en múltiples pasos secuenciales (150), hasta conseguir un medio ambiente o “*ecosistema permisivo*”, necesario para la implantación de las células tumorales en órganos diana (151). Las metástasis a distancia son las responsables del 90% de las muertes por cáncer, aunque en el caso del cáncer oral, la muerte suele producirse por la falta de control a nivel loco-regional (152).

Inicialmente, la neoplasia crece y aumenta su tamaño invadiendo sólo las estructuras adyacentes, sin diseminarse a zonas alejadas del tumor original. La falta de cohesión entre las células tumorales ayuda a explicar este proceso y la tendencia de los cánceres a

propagarse e introducirse en tejidos normales adyacentes al foco patológico primario. Es decir, la pérdida de adhesión intercelular y entre célula y matriz extracelular son requisitos fundamentales para la progresión tumoral (150).

En términos generales, una célula tumoral tiene seis veces menor poder de adherencia que la célula normal. En circunstancias normales, las células crecen y se desplazan hasta encontrar un obstáculo, con lo que se detiene su curso y simultáneamente, la síntesis de ADN. Es decir, la densidad celular constituye un freno para la expansión celular. Sin embargo, las células cancerosas no presentan tal inhibición, por lo que continúan proliferando fueran cuales fueran las restricciones de presión en su lugar de desarrollo. Existe además, una ausencia de guía de contacto en las células cancerosas. Las células normales crecen siguiendo una red arquitectónica, que conserva un orden estructural de crecimiento. Las células neoplásicas se desarrollan constituyendo masas desordenadas, con la libertad de organizarse de cualquier modo (151).

Un factor importante que facilita la invasión local, es la secreción por parte de las células tumorales de factores enzimáticos y tóxicos. Los primeros actúan disminuyendo la adhesividad celular y permitiendo que productos celulares neoplásicos penetren en las células normales. Además, algunas de las enzimas secretadas son destructoras específicas (líticas), que destruyen el tejido circundante. La secreción de sustancias tóxicas, una vez fagocitadas por las células normales, inducen la alteración local y el crecimiento tumoral (153).

La resistencia a la invasión, depende de la estructura del tejido en cuestión. Aquellas estructuras constituidas por gran cantidad de tejido elástico, como el cartílago, los tendones, los ligamentos, los vasos linfáticos y las venas, son más resistentes a la invasión. No ocurre lo mismo con los tejidos de sostén, los músculos y las arterias (dotados de una menor cantidad de tejido elástico) que son invadidas con mayor frecuencia.

Los tumores poseen diferentes características invasivas que responden a la naturaleza de cada uno de ellos. Hay neoplasias con un alto poder de invasión local, mientras que su capacidad de metástasis es limitada. Otro tipo de tumores, si bien son capaces de invadir localmente, producen metástasis con gran rapidez. Pero también existen algunos tumores que presentan tanto una gran capacidad para invadir localmente, como una

metástasis precoz. Todas estas características diferenciales de cada tipo tumoral, inciden ampliamente en el pronóstico del paciente (151).

Estudios recientes sugieren que la expresión aberrante de moléculas de adhesión intercelular, como la *cadherina-E* (115), moléculas de adhesión entre célula y matriz extracelular (integrinas $\alpha_6\beta_4$ y laminina $5\gamma_2$) y metaloproteinas de la matriz (*MMPs*), se relacionan con el comportamiento biológico del tumor a través de la adquisición de un fenotipo invasivo (4,109). Neppelberg et al., afirman que, la no reducción de *cadherina-E* en el liquen plano precanceroso, es un signo de malignización y transformación en COCE (154).

En la actualidad, se sabe que para que la célula tumoral inicie la invasión del tejido adyacente y dé lugar a la metástasis, es necesaria toda una cascada de reacciones proteolíticas, en la cual participan la serina, el thiol y las metaloproteasas. Se ha observado que algunas de esas enzimas proteolíticas, se encuentran circulando, mientras que otras son sintetizadas y secretadas por las mismas células tumorales. También se sabe que existen varios inhibidores específicos de cada una de las familias de proteasas que pueden limitar la degradación de la matriz y con esto inhibir la propagación tumoral (153).

Las moléculas de adhesión, regulan el crecimiento y diferenciación de las células epiteliales y juegan un importante papel en el mantenimiento de la integridad estructural y la organización del epitelio escamoso estratificado. La reducción de la integridad de la adhesión intercelular, ha sido implicada en la pérdida de diferenciación celular, acompañada por una mayor movilidad e invasividad de las células epiteliales neoplásicas en diversos carcinomas humanos (155).

Tras la invasión local, se produce el desprendimiento y la diseminación vía linfática o hematógena de la célula cancerosa, la cual viaja a través del flujo venoso, hasta alojarse en un órgano donde dará origen a otros tumores. Se calcula que aproximadamente el 0,01 % de las células cancerosas llegan a establecerse en un sitio distante, pues no todas tienen los recursos para sobrevivir el recorrido hasta otra zona corporal. Una gran cantidad de células cancerosas en circulación mueren, dado que no están equipadas para superar todo el proceso de metástasis. Las células tumorales que llegan a su destino, tal vez no puedan reaccionar ante factores orgánicos específicos y esto también las elimina.

Ciertos estudios llevan a concluir que algunos tumores sólo producen metástasis en órganos específicos. Tales investigaciones muestran que, si bien las células cancerosas pueden alcanzar todos los órganos del cuerpo, sólo poseen afinidad por algunos (148).

II.3. DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER ORAL

El COCE es, en la mayoría de los casos, bastante característico desde el punto de vista clínico. Sin embargo, aunque las lesiones son bastante significativas, la existencia de otros muchos procesos similares clínicamente, hace necesario en todos los casos que el diagnóstico se confirme por medio de técnicas complementarias (156).

II.3.1. DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO Y ULTRAESTRUCTURAL

Para determinar la estirpe tumoral es preciso realizar un estudio histológico del mismo, mediante el análisis de una biopsia representativa del tejido neoplásico.

Como hemos dicho anteriormente, aunque el COCE es, en la mayoría de los casos, fácil de reconocer clínicamente, es necesario en todos los casos que el diagnóstico se confirme por medio del análisis anatomopatológico (5,6).

Para ello, se realiza una toma de biopsia de forma convencional con bisturí frío, eléctrico o con láser, siendo necesario incluir tejido tumoral, margen de la lesión y tejido sano. Habitualmente se emplea una tinción de hematoxilina y eosina. El estudio con microscopía de luz sigue siendo la base fundamental del diagnóstico histopatológico de la mayoría de las lesiones orales, incluido el COCE (5).

Las atipias celulares, las alteraciones epiteliales en la estructuración de estratos (islotes y/o cordones invasivos de células epiteliales malignas similares a las células de la capa espinosa), mitosis anormales en cuanto a número, forma y localización y las modificaciones de la queratinización, son características comunes en el diagnóstico histopatológico del carcinoma. (53)

Las células neoplásicas presentan, en general, citoplasma eosinófilo abundante con núcleos grandes y un aumento de la relación núcleo-citoplasmática. Frecuentemente, se observan grados variados de pleomorfismo celular y nuclear (50).

Es necesario determinar también el grado de invasión del tumor, según haya atravesado o no la membrana basal (carcinoma *in situ* o carcinoma invasivo), así como la diferenciación tumoral.

Existen diferentes variantes en cuanto al grado de diferenciación, dependiendo del parecido que presente el tumor con la arquitectura normal del epitelio. Los carcinomas que producen cantidades importantes de queratina y muestran algún signo de maduración desde la capa basal a la capa córnea, se denominan bien diferenciados. Los que no producen queratina, pero sí es posible reconocer cierto grado de estratificación, a pesar de su desviación de la estructura normal, se denominan moderadamente diferenciados. Cuando no producen queratina, y su aspecto apenas muestra semejanza con una estructura epitelial normal, además de observarse anomalías celulares frecuentes, se denominan poco diferenciados (53).

Sin embargo, el diagnóstico del tumor no ofrece toda la información necesaria para su seguimiento y tratamiento. Durante muchos años se viene observando que tumores idénticos desde el punto de vista histológico tienen una evolución clínica muy diferente, por ejemplo, en cuanto a su capacidad de producir metástasis. Además, en muchos casos de tumores pobremente diferenciados es imposible por medio de microscopía óptica conseguir un diagnóstico exacto.

Por todo ello, es necesario estudiar estos tumores con mayor profundidad, por medio de técnicas más avanzadas que permiten obtener información más detallada de su comportamiento (156).

La principal limitación de la microscopía óptica, es su escasa capacidad de magnificación. Aunque permite visualizar la morfología de las células y sus estructuras principales (núcleo, nucleolo, citoplasma...), no permite la identificación de estructuras más reducidas (desmosomas, membranas, microvellosidades...). Para ello es preciso el uso de la microscopía electrónica, cuyo poder de magnificación es mucho mayor (116).

Las muestras para microscopía electrónica se fijan en glutaraldehído y posteriormente se incluyen en resinas sintéticas, para poder realizar cortes ultrafinos (10 veces más delgados que los de microscopía de luz). La tinción se realiza con sales de metales pesados como citrato de plomo, tetróxido de osmio o acetato de uranilo, que permiten un contraste adecuado del tejido bajo el haz de electrones. Los cortes se montan sobre grillas de cobre, se tiñen y se observan al microscopio electrónico. Para documentar los hallazgos, es necesario obtener fotografías en blanco y negro de las preparaciones.

En la microscopía electrónica de transmisión, la preparación es atravesada por un haz de electrones, proporcionando la imagen sobre una pantalla. El microscopio electrónico de transmisión es capaz de generar un haz de electrones a alta tensión (80kV) y concentrarlo sobre la preparación mediante un sistema de campos electromagnéticos equivalentes a las lentes en el microscopio de luz. La microscopía electrónica de transmisión es especialmente útil en oncología, fundamentalmente en el diagnóstico de neoplasias malignas, ya que permite identificar la estirpe o diferenciación celular de una neoplasia. Con la microscopía electrónica de transmisión es posible distinguir elementos de diferenciación celular no apreciables con microscopía de luz. Por ejemplo, la observación de desmosomas en un tejido tumoral nos orienta al diagnóstico de carcinoma; las microvellosidades bien desarrolladas, sugieren que podemos estar ante un adenocarcinoma; la aparición de melanosomas indican un posible melanoma; el hallazgo de gránulos densos rodeados por membranas, nos orientan hacia un carcinoma neuroendocrino, etc (5,91).

II.3.2. INMUNOHISTOQUÍMICA

A pesar de la gran utilidad de estas técnicas, el estudio de un tumor no puede centrarse exclusivamente en el análisis morfológico de las células y sus componentes. Existen otros muchos factores importantes para su diagnóstico y tratamiento. Por un lado, es fundamental para el diagnóstico de muchas neoplasias indiferenciadas, conocer su estirpe celular por medio de la identificación de proteínas y antígenos de superficie. Éste es el objetivo primordial de las técnicas inmunohistoquímicas (30).

La IHQ engloba un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar la presencia de una gran variedad de antígenos en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. Esta reacción se hace visible mediante el marcado de los anticuerpos con sustancias que absorben o emiten luz (116).

Se ha visto que la inmunohistoquímica tiene utilidad diagnóstica en la identificación de marcadores pronósticos de diversas neoplasias (marcadores tumorales). Por ejemplo, es posible la identificación de los productos de oncogenes y de genes supresores tumorales

con anticuerpos monoclonales, como *c-erbB-2*, *bcl-2*, *p21*, *Rb1* y *p53*. También es posible la identificación de marcadores de diferenciación como *HMB-45* para melanocitos (melanoma), *AE1* para carcinomas, vimentina para sarcomas y *CD45* para leucocitos (linfomas). Aunque el diagnóstico histológico del COCE casi siempre se realiza mediante la microscopía óptica convencional, la aplicación de la inmunohistoquímica mediante marcadores para citoqueratinas puede ser útil en distinguir tumores pobremente diferenciados o indiferenciados de otras lesiones malignas (50).

Existen diferentes opiniones en la literatura en relación a la utilización de la inmunohistoquímica para la identificación de marcadores tumorales en el COCE con el objetivo de predecir su comportamiento y evolución clínica, por lo que hay una acuciante necesidad de investigación de nuevos indicadores pronósticos, a fin de valorar la agresividad biológica de las lesiones propias de cada paciente.

II.3.3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Existen numerosas técnicas para estudiar directamente el ADN tumoral, tanto en el propio tejido, a través de la manipulación previa del mismo. Entre las más difundidas encontramos la hibridación *in situ*, la técnica *Southern Blot* (que puede ser considerada como una de las precursoras de los *microarrays*), *Northern Blot*, PCR (reacción en cadena de la polimerasa), y las técnicas de secuenciación automática (116).

La **hibridación *in situ*** consiste en la unión específica o hibridación de fragmentos marcados, de ADN monocatenario o de ARN, con sus secuencias complementarias. Para ello, se utilizan sondas complementarias de un fragmento conocido de ADN, que se marcan con un isótopo radiactivo o bien con una sustancia colorante. La importancia de la realización *in situ*, es decir, que se visualice la reacción en las células del tejido original, radica en que de esta forma es posible detectar la localización exacta en el tejido de un determinado gen o qué tipos celulares lo expresan. La hibridación *in situ* se utiliza primordialmente en la detección de bajo número de copias de virus, tanto virus no carcinógenos (*CMV*) como carcinógenos (*PVH*, *HBV*, *VEB*) (157-159).

La técnica de *Southern blot* permite el análisis de ADN genómico o fragmentos definidos de ADN después de la digestión con enzimas o endonucleasas de restricción. Cada enzima de restricción reconoce secuencias específicas diferentes, por lo que distintas moléculas de ADN pueden ser digeridas por diferentes enzimas de restricción, en base a su secuencia de nucleótidos (160).

Previamente a su hibridación, el ADN se aísla del resto de los componentes celulares y una vez digerido con las enzimas de restricción adecuadas, se separan mediante electroforesis los distintos fragmentos originados, en base a sus diferentes tamaños. Los fragmentos separados, que presentan en el gel un patrón de distribución que es característico de cada ácido nucleico, pueden ser transferidos desde el gel a soportes sólidos (membranas de nitrocelulosa o *nylon*), conservando el mismo patrón de distribución que presentaban. Posteriormente, las membranas con el ADN se exponen a una sonda marcada, que hibridará con aquellas secuencias que presenten homología con ella, haciendo posible su visualización en función del tipo de marcaje de la sonda. La transferencia del ADN contenido en un gel a membranas de nitrocelulosa o de *nylon* puede realizarse por capilaridad, aplicando la membrana sobre el gel y sobre ella papel absorbente, que arrastre en un tampón adecuado los fragmentos nucleotídicos. Esta técnica se utiliza en el diagnóstico y detección de portadores de enfermedades monogénicas, cuando se conoce la mutación responsable de la enfermedad. Requiere que se conozca cuál es la mutación responsable de la enfermedad y que el gen haya sido clonado, para poder disponer de una sonda específica, o que exista una sonda de algún marcador ligado a la enfermedad (161,162).

Empleando el mismo procedimiento, pero empleando ARN en lugar de ADN, se realiza la técnica de *Northern blot*. Con esta técnica podemos conocer si un determinado gen se expresa o no en el tejido u órgano estudiado, ya que permite la detección del ARNm correspondiente (163,164).

Un avance significativo en las técnicas de biología molecular se produce con el descubrimiento de la técnica denominada “reacción en cadena de la polimerasa” o **PCR** (*polymerase chain reaction*), desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Es un método enzimático que permite obtener múltiples copias a partir de un segmento predeterminado de ADN. Las muestras pueden obtenerse de material de autopsias, biopsias y muestras citológicas. Es una técnica extremadamente sensible, ya que es

suficiente con disponer de una única célula. Esta técnica requiere una enzima especial, la *Taq-polimerasa*, que añade el primer nucleótido al cebador o *primer* y posteriormente los nucleótidos necesarios, replicando el fragmento que queremos multiplicar. Una vez amplificado el ADN, éste puede identificarse mediante electroforesis en gel de agarosa o mediante *Southern blot*.

Es una técnica con múltiples aplicaciones, ya que se utiliza como paso previo a cualquier otra técnica que requiera utilizar cantidades importantes de ADN. Se utiliza por ejemplo, para la detección de expresión de oncogenes y genes supresores tumorales en neoplasias, clonalidad de linfomas, identificación de agentes infecciosos como virus, bacterias y micobacterias y en el estudio de mutaciones (165-167).

Durante la segunda mitad del siglo XX, los biólogos moleculares se han concentrado básicamente en la realización de estudios sobre un gen concreto o una proteína concreta. Sin embargo, a medida que entramos en la “era genómica”, este tipo de investigaciones ha ido evolucionando desde el estudio de sistemas de una sola variable hasta el estudio de interacciones mucho más complejas y con multitud de variables a la vez. Así, en lugar de estudiar la expresión de genes individuales, las nuevas tecnologías permiten investigar la expresión de una parte o incluso todos los genes de una célula o un tejido, es decir, su perfil de expresión génica (30).

La nueva tecnología de *arrays*, también denominados **chips o matrices de ADN**, proporciona por primera vez, la capacidad de analizar los niveles de expresión de decenas de miles de genes en un tejido concreto y en un momento determinado. Además, los *arrays* no sólo proporcionan información estática sobre la expresión génica (en qué tejido se está expresando el gen), sino también información dinámica (la relación de los patrones de expresión de un gen determinado con el resto de genes del *array*) (168).

Un *array* de ADN es un montaje ordenado de decenas, centenas o miles de moléculas individuales de ADN, con una secuencia conocida, sobre un soporte físico.

Los experimentos por medio de *arrays* consisten en analizar la interacción resultante de la combinación de un grupo de moléculas, como fragmentos de ARN, ADN, proteínas, anticuerpos, etc., con otro grupo predeterminado y conocido de moléculas diana.

En función del tamaño de los puntos o *spots*, podemos diferenciar entre *macroarrays* y *microarrays*. En los *macroarrays* el punto o *spot* tiene un tamaño de alrededor de 300 micras o mayor y en los *microarrays* el tamaño del punto es de alrededor de 200 micras de diámetro o menor.

Los *arrays* se fundamentan en una propiedad del ADN: el emparejamiento complementario de sus bases. El ADN consta de cuatro bloques de construcción, reconocidos por la primera letra de sus bases químicas: A (adenina), C (citosina), G (guanina) y T (timina). En una cadena de ADN la base adenina sólo se emparejará con timina (su complementaria) de otra cadena y la base citosina sólo lo hará con guanina. Por tanto, si una molécula de ADN de una muestra de tejido se une a una sonda con una secuencia conocida, conoceremos también la secuencia de la muestra (puesto que será la complementaria).

Cada una de las sondas de ADN se dispone en un lugar determinado de la rejilla o micromatriz, parecida a un tablero de ajedrez, y las moléculas de ADN que se vierten sobre la plantilla, portan un marcador fluorescente que puede detectarse con un *scanner*. Una vez leída la micromatriz por el *scanner*, los datos se convierten en una impresión con un código de colores (116).

II.3.3.1. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

La PCR (Polimerase chain reaction) ha revolucionado la detección de ADN y ARN, permitiendo la detección de cantidades tan pequeñas como una única copia de una secuencia de estas moléculas (169). La PCR convencional se considera cualitativa, expresando sus resultados en términos de positivo o negativo. Sin embargo, la PCR cuantitativa en tiempo real permite en pocas horas una cuantificación altamente sensible de niveles de una determinada molécula de DNA o RNA con una mínima manipulación de las muestras (170).

La RT-qPCR combina simultáneamente la amplificación de una molécula diana de DNA con su detección mediante una sonda de ADN. Como consecuencia de la realización de todas las reacciones en un sistema cerrado, el riesgo de contaminación se reduce significativamente.

Existen distintos formatos comercializados de sondas de ADN, como las sondas TaqMan (Figura 3), FRET y Molecular Beacons. La actividad 5' nucleasa de la polimerasa de ADN Taq se utiliza para escindir la sonda TaqMan durante la PCR. La sonda TaqMan se hibrida con un segmento de ADN distinto al iniciador de la PCR. La sonda contiene un marcador fluorescente en el extremo 5' (*reporter*) y un inhibidor de la fluorescencia en el extremo 3' (*quencher*). Durante la PCR se sintetiza una cadena de ADN complementaria y la actividad 5' exonucleasa de la polimerasa de ADN Taq libera la molécula fluorescente de la sonda (*reporter*), emitiendo fluorescencia como resultado del alejamiento del inhibidor (*quencher*) (116).

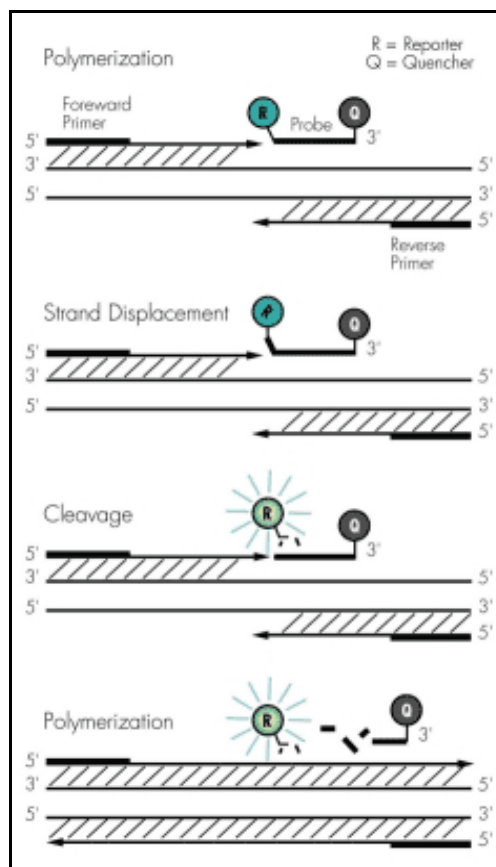


Figura 3. Esquema en el que se representa el proceso bioquímico de la RT-qPCR, utilizando una sonda TaqMan. La sonda contiene un marcador fluorescente en el extremo 5' (*reporter*) y un inhibidor de la fluorescencia en el extremo 3' (*quencher*). La actividad 5' nucleasa de la polimerasa de ADN Taq se utiliza para escindir la sonda TaqMan durante la PCR, liberando la molécula fluorescente de la sonda (*reporter*), emitiendo fluorescencia como resultado del alejamiento del inhibidor (*quencher*). Imagen cedida por el Dr. Baylor.

Actualmente, la tecnología de *arrays* es fundamentalmente útil a la hora de establecer un patrón general de expresión genética y de llevar a cabo un *screening* previo de expresión genética diferencial. La validación de tales resultados requiere un método alternativo como el *Northern blot* o RT-qPCR. La RT-qPCR permite evaluar la acumulación de producto durante la fase logarítmica de la reacción de PCR y actualmente es la estrategia más segura y reproducible para la cuantificación génica, y el método más utilizado para validar los resultados de expresión génica obtenidos mediante la tecnología de *arrays* (171-173).

II.3.3.2. Alteraciones genéticas en el COCE

Para conseguir identificar la expresión génica asociada al COCE, muchos investigadores han combinado técnicas de hibridación de *arrays* de ADN, con otras técnicas moleculares, como la RT-qPCR, que permiten examinar la expresión genética diferencial.

En la actualidad, son múltiples los estudios acerca de *microarrays* y el cáncer de cabeza y cuello, concretamente en el COCE (4,174-194). La mayoría de estos estudios establecen la hipótesis de una posible asociación entre un número variable de genes y el COCE. Muchos de ellos son genes conocidos y previamente descritos, mientras que otros nunca han sido analizados con detenimiento y se desconoce su función biológica. A partir de estos estudios con *arrays* de ADN, estos nuevos genes pueden ser investigados individualmente para descifrar su naturaleza y función (4).

Uno de los trabajos acerca de *microarrays* y el cáncer oral es el realizado por nuestro grupo de investigación (10), en el que se estudian 5 pacientes con COCE y se analiza la expresión génica diferencial del COCE mediante el *array Atlas Glass Human 3.8 I Microarray* (Clontech Laboratories, Palo Alto, Ca, USA). Este *microarray* consta de 3.757 oligonucleótidos y 9 genes *housekeeping*, así como controles hasta completar un total de 3.888 *spots*. Los genes seleccionados son genes conocidos y bien caracterizados que abarcan un rango amplio de funciones biológicas. Somoza et al., encuentran 426 genes que presentan diferencias estadísticamente significativas entre tejido tumoral y

tejido normal. De éstos, 322 (75,58%) aparecen inducidos o sobreexpresados y 104 (24,41%) reprimidos o subexpresados (10).

En cuanto a las alteraciones genéticas en el COCE, estudios recientes han observado polimorfismos alélicos en los genes *HLA* y *MICA* (complejo principal de histocompatibilidad MHC de tipo I, relacionado con el gen A (195). *HLA-B35* y *HLA-B40* fueron altamente relacionados con las metástasis tumorales (196).

Anormalidades en determinados oncogenes como el *ErbB1* o *Her-1* y el *ErbB2* no han sido determinantes en el caso de los cánceres orales. Lo mismo ocurre con los oncogenes *N-*, *K-* y *H-ras* (197,198).

Alteraciones en los genes que codifican la síntesis de las proteínas ciclinas pueden comportarse como oncogenes. En concreto, la sobreexpresión de *CCND1* induce una sobreexpresión de la proteína *ciclina D*, que se relaciona con un pobre pronóstico en tumores orales poco avanzados (199,200).

Las alteraciones en los genes supresores tumorales también están presentes en las lesiones orales malignas. La mayoría de los COCEs presentan una expresión alterada de al menos uno de los miembros del sistema *pRb*. El gen *CDKN2A*, que codifica la proteína *p16*, se localiza en el locus 9p21, una de las áreas más vulnerables del genoma humano en el cáncer oral. De igual forma, el transcrito alternativo del gen *CDKN2A*, *p14*, está también frecuentemente inhibido en lesiones orales malignas. Uno de los genes supresores tumorales más importantes en el ser humano es el *TP53*. La supresión de las funciones de este gen y su sistema molecular asociado se observa en numerosos tumores humanos y constituye uno de los hallazgos más precoces en la historia natural del cáncer oral (199).

Se han descrito tres aberraciones cromosómicas (delecciones) frecuentes: 2q21-24, 2q33-35 y 2q37, las cuales afectan a varios genes supresores de tumores como *LRP1B*, *CASP8*, *CASP10*, *BARD1*, *ILKAP*, *PPP1R7* e *ING5* (201). Recientemente se ha observado que la pérdida de los alelos 3p14 y 9p21, aparece tempranamente en la tumorigénesis del COCE, incluso en los estadios de queratosis simple. Por el contrario

la polisomía 3 ocurre más frecuentemente que la 9 y es más característica de la displasia y el carcinoma *in situ* (202).

Determinados estudios comunican una alta prevalencia de pérdida de heterocigosidad (LOH) o deleciones en los loci cromosómicos 13q y 17p en lesiones orales premalignas y carcinomas precoces. Estas regiones cromosómicas albergan importantes genes supresores tumorales cuya función preventiva del desarrollo tumoral probablemente se altera profundamente por la aberración cromosómica. El cromosoma 9 parece ser una de las dianas más precoces y sensibles en el desarrollo del cáncer, habiéndose documentado pérdidas alélicas en la región 9p21 en la mayoría de las lesiones orales premalignas y de los carcinomas incipientes (203).

La región 9p21 alberga genes que codifican los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas *p16* y *p14*, que actúan como importantes reguladores de la proliferación celular. Así mismo, algunas regiones del cromosoma 3, especialmente 3p25, 3p21 y 3p13-14, son frecuentes portadoras de aberraciones cromosómicas en el cáncer oral, aunque los genes que se alteran por estos imbalances alélicos son aun desconocidos. Otras aberraciones se asocian comúnmente a estadíos tumorales avanzados o aparecen por lo general, en carcinomas pobremente diferenciados. Ejemplos de ellos son las pérdidas alélicas en 5q21-22, 22q13, 4q, 11q, 18q y 21q (199).

También se han encontrado tres polimorfismos simples de nucleótidos (SNPs) en la región promotora de *DNMT3B*, *C46359T* (-149C>T), -238T>C y -579>T, los cuales pueden ser factores etiopatogénicos de varios cánceres entre ellos el COCE (131).

Por el contrario, se ha demostrado el escaso o nulo papel del sistema de reparación de excisión de bases (BER), el cual comprende los genes *MUTYH*, *OGG1* y *MTH1* y la reparación de mutaciones que implican a la 8-oxiguanina en el COCE (130).

Lo mismo ocurre con el análisis de proteínas asociadas a la región organizadora nucleolar (AgNORs), dónde los resultados son negativos aunque controvertidos (184). Teresa et al., afirman que el análisis de AgNORs en combinación con *Ki-67* permite la determinación de estados proliferativos de las células epiteliales en el cáncer oral (196,204). Schwartz et al., han podido demostrar la expresión elevada de antígeno nuclear de proliferación celular de manera experimental (205).

Otras moléculas relacionadas con el COCE son: la ciclooxygenasa-2 (*COX-2*) la cual aparece en cantidades elevadas en lesiones displásicas (2). El antígeno de superficie celular tropoblástico humano (*TROP2*), el cual parece estar asociado con un descenso de la supervivencia (206). La molécula de adhesión epitelial (*EpCAM*), la cual se relaciona con el tamaño del tumor, las metástasis a los nódulos linfáticos regionales, la diferenciación histológica y el patrón invasivo (201). El factor de crecimiento de tejido conectivo *CCN2* (*CTGF/CCN2*) ha sido recientemente relacionado con el COCE de cabeza y cuello; aparecen niveles elevados de RNAm y su proteína en los fibroblastos estromales, las células tumorales y en las células vasculares endoteliales (207). La sobreexpresión de *MMP-2* y *MMP-9* se ha relacionado con el potencial invasivo de los tumores, así como con los niveles de alcohol, lo que ha inducido a determinados autores a teorizar sobre la posibilidad de que la participación del alcohol en la carcinogénesis oral, se realice a través del estímulo de estas *MMPs* (199).

Los análisis moleculares en saliva demuestran que sólo son útiles los análisis genómicos de DNA con RT-qPCR, es decir que los extractos salivares no permiten análisis de expresión de RNAm (208). Siguiendo esta línea, existen estudios que verifican la presencia del fragmento soluble de citoqueratina 19, el *Cyfra 21-1*, aunque se necesitan más estudios para determinar su valor diagnóstico y pronóstico real (209,210). Estudios recientes demuestran la aplicación de la determinación de proteínas y DNA oxidados en muestras de saliva como manifestación de niveles elevados de ROS (especies de oxígeno reactivo), los cuales parecen estar implicados en el desarrollo del COCE (211).

Estudios recientes relacionan los niveles de un conjunto de nuevas moléculas, los *AGEs* (productos finales de la glicosilación avanzada) y sus receptores (*RAGE*) con el cáncer oral. Según Landesberg et al., los niveles de *RAGE*, van descendiendo a medida que empeora el nivel de diferenciación del COCE. En las células epiteliales normales, la expresión de *RAGE* es del 100%, y en los COCE mal diferenciados, la expresión es del 0% (212).

Las alteraciones epigenéticas más frecuentes consisten en metilación de DNA. Imai et al., han demostrado recientemente la expresión de los genes de la familia *RAS*, concretamente, del *RAS-SF2*, el cual aparece metilado en el 26% de los COCE (213).

Nuestro grupo de investigación ha encontrado una muy importante relación entre el COCE y el gen *ATP6V1C1*, en el cual éste aparece sobreexpresado (11). *ATP6V1C1*, será objeto del presente estudio por sus funciones biológicas y posibles implicaciones terapéuticas y de screening en el cáncer oral y otras lesiones precancerosas.

II.3.4. CITOLOGÍA EXFOLIATIVA

Los métodos diagnósticos clásicos para las lesiones cancerosas y precancerosas orales son el examen clínico y el estudio histopatológico del material obtenido por biopsia. El análisis biópsico es todavía la técnica más aceptada para determinar de un modo fiable la naturaleza de las lesiones de la mucosa oral (9,214).

La toma biópsica es una prueba cruenta que implica actuar quirúrgicamente, con limitaciones técnicas para algunos profesionales y con implicaciones de orden psicológico en algunos pacientes. También presenta limitaciones en el caso de lesiones extensas, en las que es importante seleccionar el lugar más adecuado, ya que las características histopatológicas pueden cambiar dependiendo de la zona, lo que puede provocar un mal diagnóstico y un planteamiento terapéutico erróneo. Además, el estudio biópsico con ser fundamental, no deja de ser un método diagnóstico con sensibilidad limitada, en el que prima en gran medida la subjetividad del patólogo observador (215).

Todos estos aspectos nos indican la importancia que tiene el descubrir y desarrollar nuevos métodos diagnósticos, así como mejorar los ya conocidos y buscar también dianas terapéuticas para la enfermedad neoplásica oral. Es importante que las metodologías sean sencillas, poco cruentas y fiables, y que nos permitan realizar un diagnóstico y seguimiento satisfactorios en los pacientes con lesiones precancerosas y cancerosas orales (9) (Figura 4).

En este sentido ha resurgido en los últimos tiempos el interés por la citología oral en el precáncer y el cáncer oral.

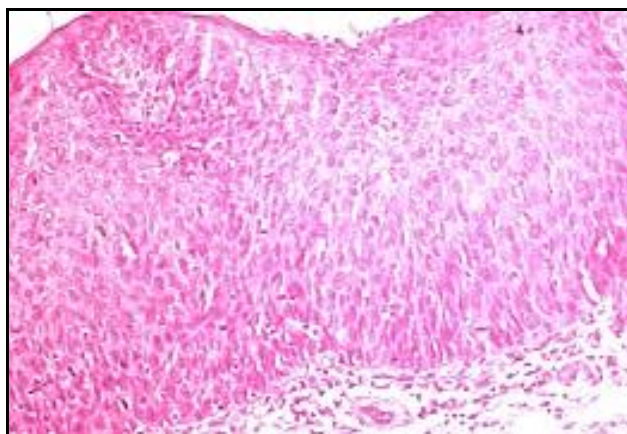


Figura 4. Citología de COCE. Hematoxilina-Eosina 40X. Imagen cedida por el Dr. Antúnez.

II.3.4.1. Concepto

La citología exfoliativa oral se define como el estudio e interpretación de los caracteres de las células que se descaman, natural o artificialmente, de la mucosa oral. Consiste en observar al microscopio la morfología de las células epiteliales superficiales después de su toma, fijación y tinción (216). Es una técnica sencilla, no agresiva, relativamente indolora y bien aceptada por los pacientes, por lo que podría ser útil tanto como metodología diagnóstica, como predictiva y para la monitorización de los pacientes en la identificación de COCEs recurrentes (6,217).

La citología se viene aplicando al diagnóstico de las enfermedades orales desde que Papanicolaou y Traut demostraran su validez para el diagnóstico de las neoplasias del cérvix uterino (218). Desde ese momento la citología comenzó a practicarse en la cavidad oral como un método de diagnóstico citopatológico, cosechando desgraciadamente muchos fracasos, debido principalmente a su mala utilización en procesos en los que era imposible que diera buenos resultados diagnósticos (219,220).

Las células orales que se van a analizar tras su extendido, pueden obtenerse mediante diferentes sistemas físicos de raspado de la superficie mucosa o mediante enjuague de la cavidad oral o bien mediante una toma de muestra de saliva de los pacientes. No obstante, la técnica con la que se obtiene un mejor material es la de raspado, que se realiza a expensas de la separación mecánica del epitelio mucoso con diferentes

instrumentos. Por ello algunos autores consideran que es más correcto hablar de “citología por raspado” que de “citología exfoliativa” como se hace en el cérvix (8,221,222).

La fiabilidad de distintos instrumentos empleados en citología oral por raspado ha sido analizada en diversos estudios (223-226). El instrumento empleado para realizar la toma citológica debe ser fácil de usar en cualquier localización, provocar pocas molestias y proporcionar un número adecuado de células epiteliales (224) (Figura 5). En estos trabajos se demuestra que el cepillo (en sus múltiples variantes), es un elemento adecuado, debido a la facilidad en la toma y a la calidad de la muestra citológica bucal (6).



Figura 5. Toma de muestra citológica con cepillo OralCDx. De izquierda a derecha: a nivel oral, laríngeo y esofágico. Imágenes cedidas por la Dra. Spivakovsky.

En cuanto a las citologías de cérvix, los resultados son controvertidos en cuanto a los distintos instrumentos. Boardman et al., afirman que los resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad con cepillo son similares a los obtenidos con cureta, aunque el uso de ésta, proporciona una mayor cantidad de muestras válidas (226). Incluso Kathleen et al., abogan por el uso del cepillo después de la aplicación de la cureta en los casos de citología de cérvix, obteniendo de esta forma una reducción todavía mayor en el número de muestras insuficientes (225).

La técnica del raspado consiste en aplicar el cepillo con una ligera presión sobre la lesión oral con un movimiento rotatorio de 360° (6).

A pesar de la mejoría de los métodos de recogida del material citológico oral, esta metodología sigue presentando problemas en el diagnóstico del cáncer oral debido

principalmente a la existencia de falsos negativos, tanto por realizar una toma no representativa como por la subjetividad de la valoración citológica (227).

Tratando de paliar estos defectos, en los últimos años hemos asistido al desarrollo de un procedimiento diagnóstico de lesiones orales malignas, llamado “*brush biopsy*” y a mejoras en el medio de transporte, con la citología en base líquida que explicaremos más adelante (7,228). Con el denominado *brush biopsy* se realiza la toma con un cepillo de diseños particulares que permite penetrar en el espesor de la mucosa y recoger material representativo de las lesiones. Este método ha sido diseñado para que recoja células desde la capa superficial a la basal del epitelio y de ese modo permita la detección de aquellas que son anómalas (224,229). La valoración de “malignidad” o “benignidad” en ocasiones se realiza mediante un análisis asistido por ordenador (230).

Como los mismos defensores de este procedimiento señalan, esta técnica no sustituye en ningún caso a la biopsia clásica, y su uso es complementario. Por ello Acha et al., afirman que la denominación “*brush biopsy*” no es acertada, ya que puede dar lugar a equívocos. Consideran que sería mejor denominarlo “*citología por raspado asistida por ordenador*” o simplemente “*oral brush cytology*” (9).

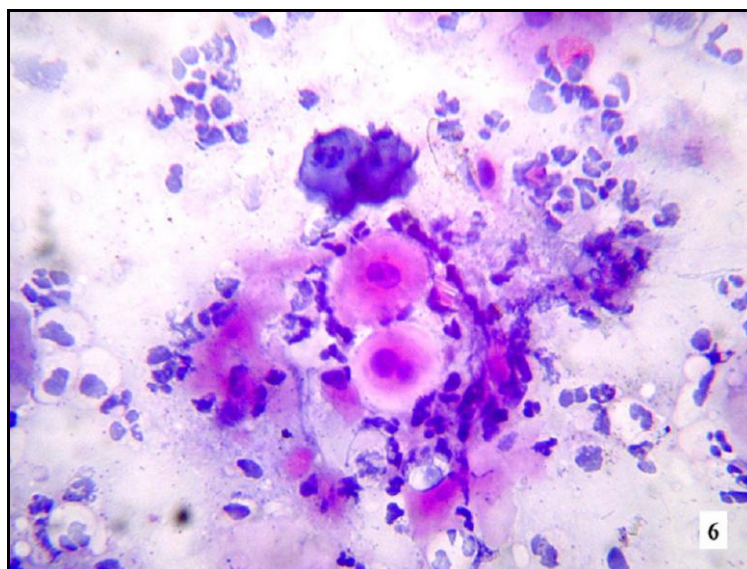


Figura 6. Fotomicrografía de una muestra de citología exfoliativa oral en un paciente con COCE de la mucosa bucal, mostrando células binucleadas con evidencia de queratinización extracelular e infiltrado inflamatorio (H&E 400X) (8).

Existen diferentes controversias en relación con el verdadero valor de esta técnica en la detección precoz del COCE (Figura 6). Se ha señalado la existencia de falsos positivos, demostrando una alta sensibilidad (90%) pero una baja especificidad (3%) (231). No obstante, estos datos han sido discutidos por otros autores en base a algunos estudios parciales (232).

Remmerbach et al., analizaron la fiabilidad de la citología oral por raspado y su análisis citométrico en el diagnóstico precoz del cáncer oral. Los resultados de este estudio fueron espectaculares ya que la sensibilidad de la citología fue del 94,6% y la especificidad del 99,5%. La valoración de los extendidos aneuploides presentó una sensibilidad del 96,4% y una especificidad del 100%. Juntando ambas técnicas la sensibilidad fue del 98,2% y la especificidad del 100%, con un valor predictivo positivo del 100% y negativo del 99,5% (233).

En el completo estudio realizado por Potter et al., encuentran 4 falsos negativos de un total de 115 casos analizados. Aunque la cantidad es pequeña hay que indicar que el retraso medio en el diagnóstico del carcinoma en estos casos fue de 117,25 días (234).

La aplicación de la citología en la detección de los fenómenos displásicos, ha sido motivo de múltiples estudios con diferentes resultados. En un estudio realizado en Sudán, se propone que el estudio citológico oral puede ser útil como método diagnóstico precoz de atipia epitelial y por tanto de lesiones orales malignas (235). Según Warnakulasuriya et al., existe una gran variabilidad tanto inter como intraexaminador, en cuanto a la presencia/ausencia de fenómenos displásicos. Existen multitud de estados displásicos sin embargo, este estudio intenta estandarizar el fenómeno displásico en No/Dudoso; leve-bajo riesgo, moderado o severo-alto riesgo, con el objetivo de minimizar la variabilidad interpretativa de los datos (Figura 7) (236).

A las clásicas aplicaciones del estudio citológico oral, como son las candidiasis orales, se han ido añadiendo otras como el estudio de la infección epitelial por el *EBV* en lesiones orales de leucoplasia vellosa (237). También se ha estudiado en citologías de saliva de pacientes tratados de COCE, el porcentaje de células apoptóticas (238). Esta detección puede ser muy interesante para monitorizar la reacción frente a la quimioterapia. Recientemente, se ha demostrado la validez de la citología oral por raspado para el análisis del número de células queratinizadas y de la actividad nucleolar

(AgNORs) en pacientes fumadores (239). Remmerbach et al., concluyen que el estudio citológico de extendidos de lesiones orales sospechosas es un método sencillo y seguro para la detección del cáncer y que el análisis AgNOR en la citología oral puede ser utilizado como un método de rutina en el diagnóstico del cáncer oral (240).

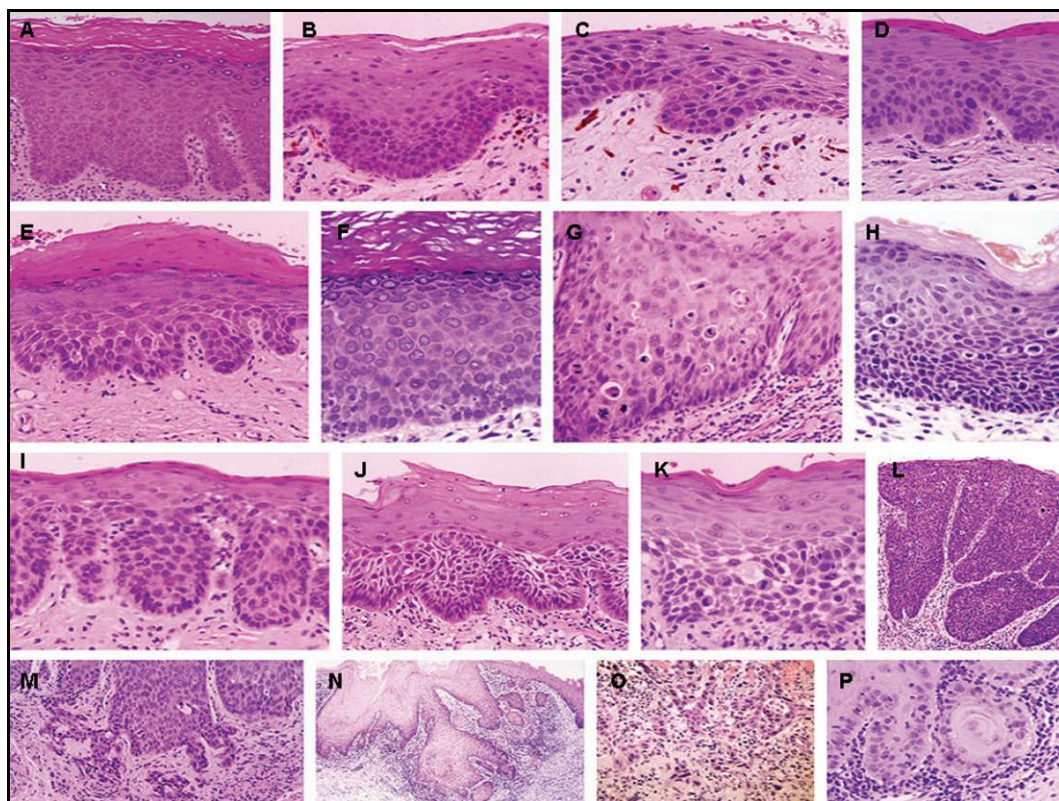


Figura 7. Diferentes grados de displasia, desde hiperqueratosis simple (A), a carcinoma invasivo con islas epiteliales en el tejido conectivo (P) (236).

II.3.4.2. Citología en Base líquida

La citología exfoliativa como frotis citológico fue originalmente ideada para la detección precoz de células cervicales cancerosas. El frotis citológico se ha usado en el diagnóstico de ciertos tipos de lesiones orales, la mayor parte de ellas provenientes de enfermedades causadas por virus u hongos (222). Actualmente con el progreso de la técnica citológica que se ha traducido en el desarrollo de preparaciones de base líquida, el uso de esta técnica como herramienta auxiliar en el diagnóstico de lesiones de la mucosa oral, ha despertado un renovado interés (241).

En las preparaciones de base líquida, la muestra y el dispositivo de recolección se transportan en un recipiente que contiene un líquido conservador. Eso permite la inmediata fijación de las células, con lo cual todo el material removido puede usarse. Esa técnica permite obtener preparaciones con abundancia de células dispersas en una capa fina y homogénea. Sangre, inflamación y mucus quedan reducidos y distribuidos por toda la preparación. El fondo claro que así se obtiene aumenta la sensibilidad y la calidad (242-244).

Comparado con los frotis convencionales, el uso de preparaciones de base líquida ha permitido reducir considerablemente el número de preparaciones insatisfactorias o satisfactorias pero limitadas, debido a las características del ejemplar, lo que disminuye el número de resultados falsos negativos (245) (Figura 8).

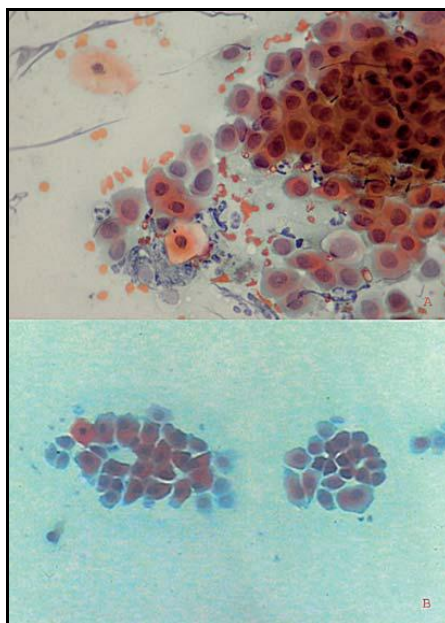


Figura 8. Pénfigo vulgar. a) Citología convencional. Frotis con sangre y leucocitos, agrupamientos de células escamosas intermedias y parabasales. b) Citología de base líquida. Agrupamientos de células escamosas intermedias y parabasales (Papanicolaou 400X) (228).

Diversos estudios han intentado determinar las ventajas y aplicaciones de la citología en base líquida con respecto a la citología exfoliativa convencional (Figura 9). Así, Hayama et al., encuentran que ambas técnicas coinciden en el diagnóstico citológico en

todos los casos en los que se usó una muestra adecuada, aunque en 3 de 44 casos de frotis convencional, los resultados mostraron hipocelularidad y por lo tanto inadecuado para el análisis. En el caso del análisis en base líquida, los resultados mostraron una mejora general estadísticamente significativa de un 41% en espesura de frotis y de un 66% en la distribución de células ($p \leq 0.05$), además de una reducción en la superposición de células y la presencia de sangre ($p \leq 0.05$). La morfología celular se observó mejor en las preparaciones de base líquida (228).

Navone et al., utilizan curetas dermatológicas y base líquida para mejorar la cantidad de material obtenido en la toma de las muestras. Encontraron sólo un 8,8% de muestras inadecuadas en el grupo de base líquida versus frotis convencional, una sensibilidad del 95,1% y una especificidad del 99,0%. Concluyen que la citología en base líquida, mejora no sólo la sensibilidad y especificidad de las muestras en el diagnóstico de lesiones malignas, sino que permite la obtención de material adecuado para investigaciones moleculares (AgNORs, DNA, microbiopsias, etc.) (7,246).

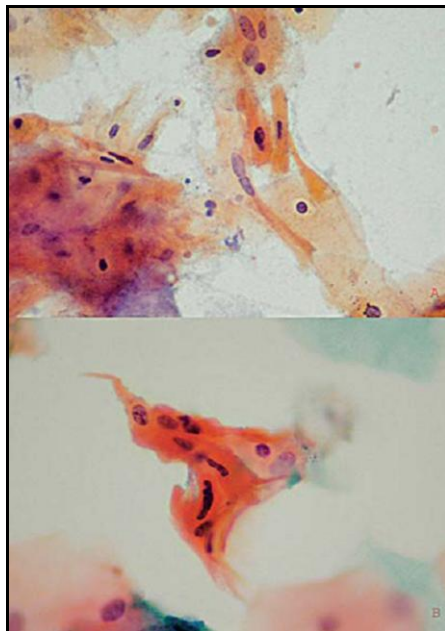


Figura 9. Carcinoma de células escamosas. a) Citología convencional. Frotis con fondo sucio, bacterias y células escamosas atípicas elongadas. b) Citología de base líquida. Células escamosas atípicas con polimorfismo celular e hipercromatismo nuclear (Papanicolaou 400X) (228).

En otro estudio, Navone et al., afirman que las microbiopsias obtenidas mediante curetas dermatológicas y citología en base líquida en la toma de muestras citológicas, permiten obtener resultados de sensibilidad incluso mayores que la biopsia (97,65% versus 85,88%). Concluyen que el valor predictivo negativo (97,33%), sugiere que la microbiopsia puede ser usada perfectamente como arma diagnóstica para la detección precoz de lesiones potencialmente malignas, sobre todo en el seguimiento de múltiples lesiones, aunque se necesitan más investigaciones para evaluar su potencia como arma de diagnóstico definitivo (247).

Brunotto et al., afirman que las alteraciones citológicas observadas en las muestras obtenidas con citología en base líquida, son indicadores suficientes de transformación maligna y por lo tanto de la necesidad de realizar exámenes posteriores (248).

En conclusión, tanto las preparaciones de base líquida como los frotis convencionales son dignos de confianza desde el punto de vista del diagnóstico. El método de base líquida muestra una mejora general en la preservación de muestras, adecuación de ejemplares, observación de morfología celular y reproducibilidad (228).

II.3.4.3. Análisis citológicos

Tras la obtención de las muestras citológicas, éstas pueden ser analizadas de diferentes maneras que vamos a desarrollar a continuación: citomorfometría, contenido de ADN nuclear en las muestras, identificación de marcadores tumorales mediante inmunohistoquímica y análisis moleculares.

II.3.4.3.1. Citomorfometría

Diversos autores sugieren que las técnicas cuantitativas, basadas en la valoración de parámetros como las variaciones del tamaño del núcleo y del citoplasma y en alteraciones en la relación núcleo/citoplasma, pueden aumentar la sensibilidad diagnóstica de la citología exfoliativa en el diagnóstico precoz del cáncer oral por ser técnicas objetivas, precisas y reproducibles (221) (Figura 10).



Figura 10. Citomorfometría. Medidas nucleares y citoplasmáticas con sistema de análisis de la imagen (Micro Image 3.0.1), en células epiteliales orales teñidas mediante el método de Papanicolau (249).

Cowpe et al., han demostrado que la citología exfoliativa es capaz de detectar cambios malignos, basándose en la determinación del área del núcleo y citoplasma en frotis teñidos con Papanicolau. En este estudio, publicado en 1985, se basan en el cálculo del área del núcleo (AN), área del citoplasma (AC) y relación núcleo/citoplasma (AN/AC) de células de la cavidad oral, usando el método del planímetro y concluyen que 50 células son suficientes para proporcionar una valoración coherente en varias localizaciones de la cavidad oral (250). Encuentran que la disminución del área del citoplasma (AC) precede a un aumento del área del núcleo (AN) en los tejidos que sufren transformación maligna. Además, sugieren que debido a la ausencia de una base de valores citométricos normales, la mucosa sana del mismo paciente proporciona un control satisfactorio (251).

Desde entonces, muchos estudios han sido realizados utilizando la técnica descrita por estos autores para valorar la influencia de diversos factores sistémicos y externos en los parámetros a ser medidos. El planímetro fue sustituido por métodos de análisis semiautomáticos de imágenes una vez que éstos mostraron ser métodos más apropiados, debido a que aumentan la velocidad, exactitud y reproducibilidad de los resultados (250,252).

Ramaesh et al., aplican técnicas citométricas para determinar los diámetros del núcleo y del citoplasma de células de la mucosa oral normal, de lesiones displásicas y de COCE. Encuentran que el diámetro del citoplasma se reduce a partir de las células de la mucosa normal, hacia las lesiones con mayor grado de displasia, hasta adquirir su menor tamaño en las lesiones de COCE. En relación al diámetro del núcleo, encuentran que éste va aumentando a partir de las células normales hacia las células de lesiones con mayor grado de displasia adquiriendo su mayor diámetro en las células de las lesiones de carcinoma oral (253).

Parece que la reducción del núcleo y el aumento del citoplasma pueden ser indicadores precoces del cambio maligno (254).

Los resultados son controvertidos, Saiz et al., describen que los parámetros índice de proliferación celular, índice mitótico, poliploidía y fase S, no pueden ser utilizados como factor pronóstico en el COCE, por no haber encontrado diferencias estadísticamente significativas con la aparición de recidiva loco-regional, metástasis a distancia ni con la supervivencia (255). Sin embargo, Pektas et al., demuestran la existencia de diploidía celular en el 83,3% de las lesiones malignas, con resultados estadísticamente significativos en relación al grupo control. Concluyen que el análisis citomorfométrico mediante citología oral es una técnica de gran valor junto con la biopsia para la identificación de lesiones premalignas y lesiones orales cancerosas en estadios precoces, con una elevada especificidad y sensibilidad sin necesidad de utilizar anestesia tópica o local (256,257).

II.3.4.3.2. Contenido de ADN nuclear

La citometría estática permite la cuantificación del contenido de ADN en células obtenidas por citología exfoliativa, sin embargo, para el análisis del contenido de ADN, la tinción de rutina con Hematoxilina-Eosina es inadecuada, por lo que se necesitan tinciones especiales para asegurarse que la cantidad de ADN es proporcional a la cantidad de tinción. La *Reacción de Feulgen* completa estos criterios, ya que es un procedimiento de tinción con carácter estequiométrico (es decir, cada molécula fijada de reactivo de Schiff se corresponde con una porción constante y equivalente de molécula

de ADN), lo que permite conocer la cantidad de ADN que contienen las diferentes células que componen la muestra. La gran ventaja del procedimiento es que sobre él puede realizarse la objetivación de esta información mediante espectrofotometría o técnicas de análisis digital de imágenes por densitometría de ADN (258).

Cowpe et al., han demostrado que la mucosa clínicamente normal en pacientes sanos, muestra un perfil de ADN diploide (250), mientras un perfil anormal de ADN se asocia con enfermedades malignas (259). Sin embargo, aunque la mayoría de las lesiones malignas orales presentan unos perfiles anormales de ADN, algunas pueden ser diploides (260,261).

La combinación de la cuantificación del contenido de ADN con la morfometría celular y nuclear, parece ser más discriminatoria a la hora de distinguir lesiones premalignas y malignas (254).

Recientemente, Sudbo et al., encuentran en cortes histológicos que el contenido de ADN tiene valor pronóstico en leucoplasias de la cavidad oral (262). La tasa de malignización para las lesiones diploides, tetraploides y aneuploides fue de 3%, 60% y 84%, respectivamente. Doseva et al., encuentran en el frotis de leucoplasias y líquenes que posteriormente sufrieron degeneración maligna, una distribución hipodiploide o hipertetraploide en vez de un patrón de ADN diploide (263). Sin embargo, Remmerbach et al., hallan que la aneuploidía es un marcador de malignidad el cual puede detectar malignización meses antes que la histología (264). Según Thirthagiri et al., la inestabilidad cromosómica (CIN), sobre todo a nivel del centrosoma, conduce a la aneuploidía y ésta a la displasia, contribuyendo a la progresión maligna del tumor (265).

Schimming et al., valoran la correlación entre la distribución de ADN y las características clínico-patológicas del COCE. Encuentran un estadio (N) significativamente más alto, una mayor frecuencia de metástasis y una menor tasa de supervivencia en los tumores no-diploides (266).

Remmerbach et al., demuestran niveles muy altos de sensibilidad (94,6%) y de especificidad (99,5%) así como de valor predictivo positivo (98,1%) y negativo (98,5%) para el diagnóstico de células cancerígenas. Concluyen afirmando la clara aplicación de

la citometría de DNA para el diagnóstico de lesiones precancerosas, carcinoma *in situ* o carcinomas invasivos en todos los estadios (233).

Así, la cuantificación del ADN nuclear podría ser útil para predecir el comportamiento de lesiones potencialmente malignas, establecer un pronóstico en lesiones malignas y detectar recurrencias post-tratamiento (254).

II.3.4.3.3. Identificación de marcadores tumorales mediante IHQ

La identificación de la expresión de marcadores tumorales en células exfoliadas de la cavidad oral ha recibido un especial interés. Entre ellos la expresión de citoqueratinas ha sido motivo de diversos estudios. El patrón de expresión de las citoqueratinas proporciona información útil con respecto al estado de diferenciación celular (267), pero su potencial diagnóstico en la detección precoz del cáncer oral es limitado, una vez que no hay un marcador de queratina presente en todas las lesiones malignas y que no esté presente en la mucosa oral normal (268).

Sin embargo, la identificación de algunas citoqueratinas, por ejemplo CK 8 y CK 19 (269), puede representar un importante indicador de una lesión maligna, particularmente si está asociada con otros marcadores (270). Según Bongers et al., la determinación de *CK 16* y *19* permite determinar cambios precoces en el proceso de cancerización, por lo que pueden ser fácilmente utilizados como screening o monitorización para diagnosticar segundos tumores primarios (271).

Kujan et al., demuestran la gran utilidad de las muestras de citología en base líquida para la determinación inmunocitoquímica de *FHIT* (triada histidina frágil) como marcador molecular de cáncer oral (272).

La mutación del gen supresor de tumor *p53* es uno de los cambios genómicos más frecuentes en el cáncer humano. De acuerdo con la mayoría de los estudios la *p53* no es detectada en la mucosa oral normal, pero puede ser demostrada a través de técnicas inmunohistoquímicas en el COCE y lesiones potencialmente malignas de la mucosa oral. De la misma forma ha sido identificada en células de tumores malignos, obtenidas por citología exfoliativa, pero no en mucosa normal (254). La mutación del *p53* está

presente sólo en aproximadamente el 50% de los COCE, lo que añadido al hecho de que la expresión de *p53* en tumores orales se ve en etapas avanzadas de la carcinogénesis (273), la citología exfoliativa no es capaz de promover la detección precoz basándose en la detección de la *p53*, dado que esta técnica es inapropiada para obtener muestras de células basales a partir del epitelio intacto (274).

Recientemente Szelachowska et al., han encontrado que el aumento de metalotianinas (MT) determinadas mediante inmunohistoquímica, está relacionado con un peor pronóstico de los tumores, aunque no encuentran relación con la actividad proliferativa (275).

Parece que el antígeno de histocompatibilidad del grupo H tipo 2 (ABH tipo 2), es un excelente marcador, incluso más que las citoqueratinas, para la monitorización de lesiones premalignas o control evolutivo de lesiones malignas (271).

La gran dificultad permanece en que no hay un único marcador presente en todas las lesiones malignas y que no esté presente en lesiones benignas y en la mucosa oral normal (221).

II.3.4.3.4. Análisis molecular. Marcadores moleculares citológicos

En gran medida el reciente interés por el estudio de la citología oral en la patología cancerosa oral, se ha debido a la aplicación de nuevas técnicas moleculares. El estudio genético de marcadores moleculares permite detectar alteraciones antes de que se produzcan cambios en la morfología celular y de que esos cambios sean clínicamente visibles (215). Según Driemel et al., la utilización de citología exfoliativa con el análisis morfológico clásico con hematoxilina-eosina, no es suficiente para una adecuada sensibilidad de la técnica (276), sin embargo combinando su uso con técnicas moleculares los resultados son más predictivos, pudiendo ser utilizada no sólo para el diagnóstico, sino también para la monitorización de pacientes (8). Mientras que la evaluación citológica oral clásica requiere una labor intensa y un elevado grado de experiencia para la identificación y valoración de células con morfología sospechosa, el análisis de las alteraciones moleculares es objetivo y trata de identificar anomalías génicas específicas (277) no sólo a nivel oral sino también cervical (194).

Marcadores moleculares citológicos

Actualmente, se considera al cáncer como un proceso causado por acumulación de múltiples alteraciones genéticas que afectan tanto al ciclo celular como a la diferenciación normal de las células. Mayoritariamente, estas alteraciones son adquiridas (somáticas) aunque algunas pueden ser heredadas y cuando activan protooncogenes, inactivan genes supresores de tumores o afectan a enzimas cuya función es reparar el ADN, pueden conducir a una transformación neoplásica (9).

Los principales carcinógenos de la cavidad oral son agentes químicos (tabaco), físicos (radiación) e infecciosos (papilomavirus, *candida*) que como mutágenos pueden provocar cambios en la estructura de genes y cromosomas mediante mutaciones puntuales, deleciones, inserciones o reordenamientos (3). No obstante, alguno de estos cambios, se pueden producir de forma espontánea. Estas alteraciones genéticas que se producen durante el proceso de carcinogénesis, pueden emplearse como dianas para la detección de células tumorales en muestras clínicas (277-279).

El análisis molecular puede identificar entre las células normales una población clonal de células cancerígenas que posean mutaciones puntuales específicas de tumor (279).

Como hemos dicho anteriormente, las mutaciones del gen supresor de tumores *p53*, son las alteraciones genéticas más frecuentes en el cáncer humano y presentan una frecuencia variable en el cáncer oral (115). Diversos autores han estudiado y en algunos casos demostrado, la potencial aplicación clínica de la citología oral para la detección de las mutaciones puntuales en *p53* como marcador neoplásico específico del COCE (118,279-281). No obstante, otros autores, consideran que el elevado número de mutaciones puntuales que se pueden encontrar en *p53* restringe su potencial aplicación clínica en la detección precoz del cáncer oral, ya que no resulta rentable (282).

También se ha estudiado la aplicabilidad de otros marcadores moleculares como las alteraciones epigenéticas (hipermetilación de regiones promotoras), la inestabilidad genómica como la pérdida de heterocigosidad (LOH) (Figura 11), la inestabilidad de microsatélites (MSI) (282-284) y el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) (285).

La metilación es la principal modificación epigenética en humanos y parece que los cambios en los patrones de metilación pueden jugar un papel muy importante en la tumorigénesis (282). Estas alteraciones epigenéticas a menudo están asociadas con la pérdida de expresión génica y parece que son esenciales para que ocurran los múltiples eventos genéticos necesarios para la progresión del tumor, ya que pueden inactivar genes reparadores del ADN. La hipermetilación de islas *CpG*, normalmente no metiladas, en las regiones promotoras, se correlaciona con una pérdida de expresión génica y pueden ser determinadas mediante citología exfoliativa (286).

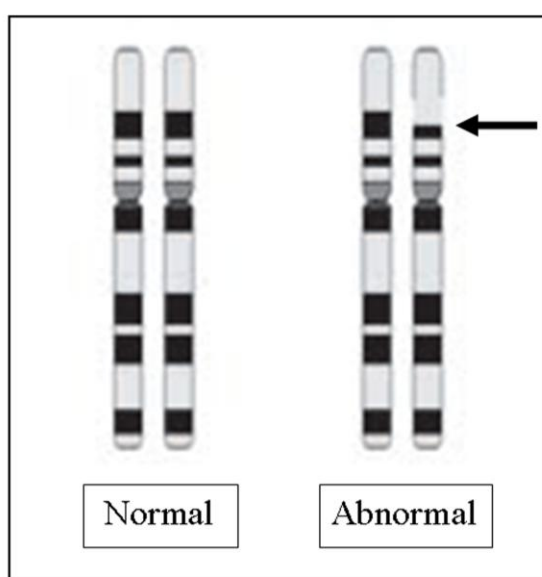


Figura 11. Pérdida de heterocigosidad dónde se muestra pérdida de región cromosómica que contiene GST (flecha). Modificado de (215).

Rosas et al., estudian los patrones de metilación de los genes *p16*, *MGMT* y *DAP-K* en carcinomas y en muestras de saliva de pacientes con cáncer de cabeza y cuello y detectan patrones anormales de hipermetilación en ambos, empleando una PCR específica de metilación. Por ello, proponen que esta técnica permite una detección eficaz y sensible de ADN tumoral y es potencialmente útil para detectar y monitorizar recurrencias en estos pacientes (282).

Generalmente la inestabilidad genética viene indicada tanto por la LOH, que refleja una pérdida alélica de la región genómica donde se localiza el locus marcador, como por la MSI, que implica un cambio del tamaño de los loci microsatélites. Existen diversos estudios que han demostrado que las alteraciones en determinadas regiones de los cromosomas 3p, 9p, 17p y 18q están asociadas con el desarrollo de carcinomas escamosos de cabeza y cuello empleando marcadores microsatélite (287,288).

Las regiones microsatélite se distribuyen a lo largo del genoma y han sido amplia y satisfactoriamente utilizadas como marcadores moleculares en carcinogénesis. Las alteraciones en estas regiones se han empleado como marcadores de clonalidad y para detectar células tumorales entre células normales (113,289). Los análisis de estas regiones pueden revelar una LOH o MSI de la región estudiada (277).

Diversos autores (277,290,291) han evaluado el análisis de loci microsatélite (LOH y MSI) en muestras citológicas orales y tejido tumoral, observando que el perfil de cambios producidos en el tejido tumoral fue similar al observado en el material obtenido por citología. De este modo, concluyen que este tipo de análisis permite detectar ADN de células tumorales de las muestras citológicas. Spafford et al., señalan también que los marcadores para el estudio de MSI fueron más eficientes que los marcadores de LOH para la detección de células tumorales entre las células normales en muestras citológicas orales (277).

Huang et al., utilizan la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar el ADN de células obtenidas mediante citología exfoliativa para el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), en carcinomas orales (285).

La PCR y la RFLP también fueron utilizadas para el análisis de marcadores de microsatélite, que son pequeñas secuencias repetidas de ADN. Las mutaciones genéticas, LOH o desequilibrio en los microsatélites (MI), son características de los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, por lo que pueden ser utilizadas como marcadores moleculares de malignidad. Nunes et al., utilizando el análisis de microsatélite en células exfoliadas de la cavidad oral por citología exfoliativa y enjuagues bucales, identificaron pérdida de heterocigocidad en 84% de los casos estudiados, aunque la identificación de esas alteraciones fue independiente del estadio

del tumor. Sugieren que esta técnica puede ser útil en el diagnóstico precoz y en el seguimiento de los pacientes con cáncer oral (292).

Más recientemente, Driemel et al., estudian la expresión de moléculas de la matriz extracelular en muestras citológicas, observando la expresión de ARNm de laminina-5 y tenascina-c en COCE (293).

Las aplicaciones del estudio molecular de la citología oral en el precáncer oral han sido mínimamente estudiadas, quizás por la dificultad en obtener un material representativo en estas lesiones. Aplicando la metodología de “*brush biopsy*” se han analizado biomarcadores de la apoptosis en células obtenidas de leucoplasias con displasia y de liquen plano. Es importante señalar que las células apoptóticas muestran el mismo aspecto morfológico que las no apoptóticas, por lo que es muy importante aplicar estas técnicas para poder diferenciarlas. En este estudio se ha demostrado un mayor porcentaje de células apoptóticas en los pacientes con leucoplasia o con liquen plano (9).

Como conclusión, podemos señalar que la citología oral vuelve a adquirir importancia como técnica diagnóstica en el precáncer y cáncer oral, tras la aplicación de las nuevas técnicas metodológicas tanto puramente físicas como moleculares. Probablemente, el análisis molecular se convierta en una técnica esencial en el diagnóstico y manejo del cáncer oral (215).

El uso de estos marcadores moleculares permitirá el diagnóstico precoz, identificando cambios antes de que éstos sean clínicamente visibles, así como la valoración de la progresión de éstos y su respuesta a distintos tratamientos. De igual manera podría ser útil en la realización de programas preventivos.

II.4. BOMBA DE PROTONES O ATP-asa

Las ATPasas son sistemas enzimáticos que se originaron a partir de un ancestro común y que tienen una distribución universal en todos los organismos. Existen tres tipos diferentes de ATPasas, las de arquea (**A-ATPasa**), las sintasas (**F- ATPasa**) y las de vacuola o vacuolares (**V-ATPasa**) (294).

Son esenciales para la vida y tienen en común el acoplar el gradiente electroquímico de iones a través de la membrana para hidrolizar o sintetizar el ATP. Estructuralmente son complejos enzimáticos que trabajan como motores rotatorios moleculares. Su estructura y función se ha conservado durante la evolución. Están formados por dos dominios, hidrofóbico (A0, V0 y F0) e hidrofílico (A1, V1 y F1) conectados por un eje central y uno o dos laterales. Los polipéptidos de mayor peso molecular, α y β en las de tipo F, o B y A respectivamente en las de tipo V o A, se originaron por duplicación génica y conservan un muy alto grado de homología (295,296), aunque con diferencias importantes como que el dominio V0 de las V-ATPasas equivalente al F0 de las F-ATPasas, no es un canal abierto de protones (297). Vamos a desarrollar únicamente las V-ATPasas por ser las implicadas en nuestro estudio.

II.4.1. BOMBA DE PROTONES TIPO VACUOLAR O V-ATPasa. FUNCIONES BIOLÓGICAS

En contraste con las F-ATPasas, cuya función primaria en las células eucarióticas es formar ATP a expensas de la fuerza motivada por protones, las V-ATPasas funcionan exclusivamente como bombas de protones ATP-dependientes, desarrollando diversas funciones biológicas dentro de las células (298-301):

- A. **Transporte de membrana:** las V-ATPasas tienen un importante papel en la endocitosis mediada por receptor (302), en el transporte intracelular y en la acidificación de endosomas tardíos (299,301,303-305). También está descrito el transporte de enzimas lisosómicas desde el aparato de Golgi a los lisosomas, mediante una acidificación vacuolar (301,306). Parece que las V-ATPasas

juegan un papel importante en la creación del micromedioambiente esencial para el correcto transporte, intercambio y secreción de proteínas (307).

B. ***Funciones en la membrana plasmática:*** aunque las V-ATPasas fueron inicialmente identificadas en los compartimentos intracelulares, se han incrementado enormemente los papeles que desempeñan en la membrana plasmática. Las V-ATPasas localizadas en la membrana apical de las células renales intercaladas tipo-A, presentan funciones en la secreción de protones en el fluido renal (308,309). Las células intercaladas tipo-B, cuya función es la secreción de bicarbonato, también contienen V-ATPasas, pero su localización es entre las membranas apical y basolateral (303,309). En macrófagos y neutrófilos, las V-ATPasas de la membrana plasmática (pmV-ATPasas) están implicadas en la homeostasis del pH citoplasmático (301,303,310). Las pmV-ATPasas representan un papel importante en la reabsorción ósea (296,301,303,308,309). Además, parecen estar implicadas en el desarrollo de metástasis tumoral. Muchas células tumorales secretan enzimas lisosómicas que participan en la degradación de la matriz extracelular necesaria para la invasión metastásica. Estas enzimas presentan un pH óptimo bajo y son las V-ATPasas las encargadas de acidificar el micromedioambiente (301,303,311). Otra función es la de controlar la motilidad y maduración de los espermatozoides en la membrana apical de las células del epidídimo y los conductos deferentes, mediante la estabilización del medio espermático (303).

C. ***Otras funciones:*** el bajo pH dentro de los lisosomas y fagosomas que es mantenido por las V-ATPasas, es necesario para la actividad de las enzimas degradativas presentes en dichos compartimento (312-314). En varios compartimentos intracelulares incluyendo lisosomas y vesículas secretoras, el gradiente de protones y/o el potencial de membrana generado por las V-ATPasas, conduce al transporte de pequeñas moléculas e iones (303,314). La fuerza de conducción para el acúmulo de neurotransmisores en las vesículas sinápticas, deriva de la fuerza motivada por los protones, generada a su vez por V-ATPasas (315). El equilibrio fusión-fisión del sistema vacuolar de las célula eucariotas, también está controlado por las V-ATPasas a través de la interacción de las proteínas vacuolares SNARE y la GTPasa Vps1p (316,317). En las

células β pancreáticas del ratón, las V-ATPasas también realizan funciones de exocitosis de hormona insulínica (296). La exocitosis en eosinófilos también está regulada por las V-ATPasas (314). La posible unión entre las V-ATPasas y el citoesqueleto se demuestra dado que las mutaciones en el gen que codifica la subunidad E, produce cambios en la morfología celular y en la actina del citoesqueleto (29). La asociación entre las subunidades de la V-ATPasa y otras proteínas celulares, como la que se produce entre la subunidad c del dominio V0 con la oncoproteína E5, el receptor del factor de crecimiento plaquetario (PDGF) y la B1 integrina, indican el papel de éstas en el crecimiento y transformación celular. Otra función es la de permitir el paso a determinados virus (influenza) o toxinas (difteria) al espacio intracelular mediante la unión de éstos a la membrana endosómica (301). En el caso del virus de la inmunodeficiencia humana, la asociación entre la subunidad H de las V-ATPasas con la proteína Nef del VIH-1 que controla la expresión de CD4 (el principal receptor para VIH), facilita la endocitosis del Nef y/o alteraciones en la acidificación endosomal por dicha proteína (296,303). La función más recientemente demostrada, es la implicación de las V-ATPasas en la regulación de la fusión célula-célula para formar células de mayor tamaño, como en el caso de los osteoclastos y macrófagos (318).

II.4.2. V-ATPasas COMO BOMBAS DE PROTONES ATP-DEPENDIENTES

El ATP es un compuesto químico lábil que está presente en todas las células. Es una combinación de adenosina, ribosa y tres radicales fosfato. Los últimos dos radicales fosfato están unidos al resto de la molécula por los llamados *enlaces de alta energía*. La liberación de cada uno de los dos radicales fosfato, libera 12.000 calorías de energía. Después de que el ATP pierde un radical fosfato, este compuesto pasa a ser difosfato de adenosina (ADP) y tras la pérdida del segundo radical fosfato, se convierte en monofosfato de adenosina (AMP). El ATP está presente en cualquier punto del citoplasma y del nucleoplasma de todas las células y prácticamente todos los mecanismos fisiológicos que necesitan energía para operar, la obtienen directamente del ATP. A su vez, los alimentos se oxidan de forma gradual en la célula y la energía liberada se utiliza para volver a formar ATP, manteniendo siempre un aporte de esta

sustancia; toda esta transferencia de energía tiene lugar por medio de las reacciones acopladas (319).

En resumen, el ATP es un compuesto intermediario que tiene la capacidad peculiar de participar en muchas reacciones acopladas: reacciones con el alimento para extraer la energía y reacciones con muchos mecanismos fisiológicos para proporcionar energía para su función. Por esta razón, al ATP se le ha llamado “moneda de energía” del organismo que puede ganarse y gastarse una y otra vez (319).

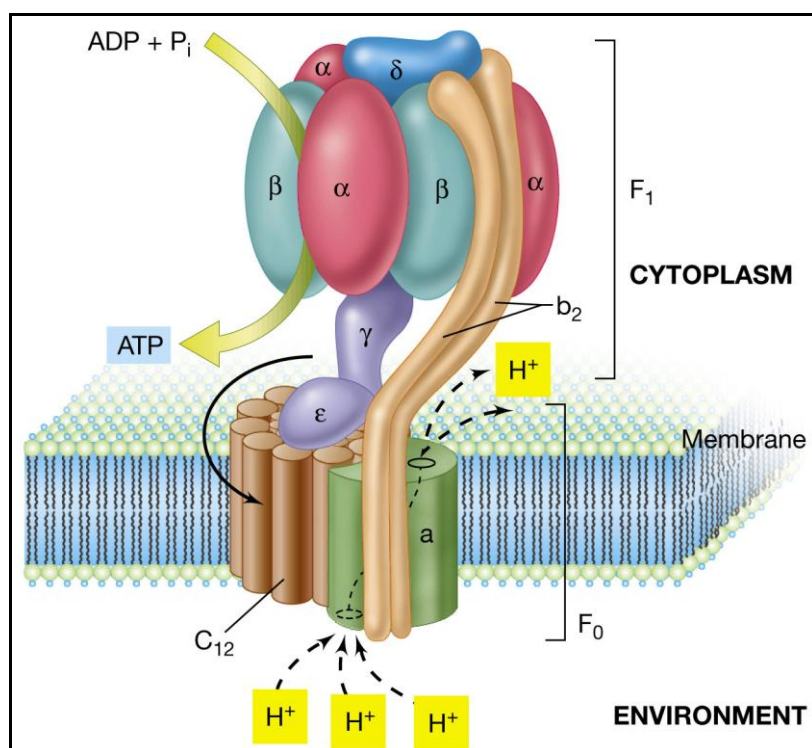


Figura 12. Esquema del funcionamiento rotatorio de la ATPasa. Imagen cedida por el Dr. Kenneth.

La fuerza motivada por protones generada por las V-ATPasas en organelas y membranas de las células eucarióticas, es utilizada como una fuerza de conducción por numerosos procesos de transporte secundario (315,320). Esta fuerza se denomina *proton-motive force* (pmf) (321).

Las V-ATPasas están presentes en la membrana plasmática de células especializadas secretoras de protones (315,322), en las cuales, translocan protones a través de membranas de diversas organelas intracelulares (lisosomas, endosomas, gránulos

secretorios, etc.). Este transporte es electrogénico y establece un gradiente de pH ácido y un potencial transmembrana positivo dentro de estos compartimentos intracelulares (323,324). Dicho mecanismo es rotatorio y permite la hidrólisis del ATP (28,304,305,325,326) de manera casi exactamente igual a archaeobacterias Na⁺-ATPasas, como el *Enterococcus hirae* o H⁺-ATPasas como el *Thermus thermophilus* (28) (Figura 12).

La V-ATPasa usualmente se localiza de forma apical a las membranas plasmáticas de las células epiteliales, hacia el lado citoplasmático de la membrana y bombea H⁺ hacia fuera. Este bombeo de protones permite siempre un voltaje trans-positivo, pero acompañado de diversos eventos. Este voltaje puede desaparecer y el transcompartimento puede volverse ácido, básico o neutral, dependiendo de la naturaleza de canales paralelos o portadores que acompañan el protón (327). Por esta razón, las V-ATPasas pueden proporcionar energía a la membrana, regular el pH intracelular y causar una acidificación o alcalinización extracelular (315).

Según Martínez-Muñoz et al., la actividad de la V-ATPasa es esencial a corto plazo, tanto para la acidificación vacuolar en respuesta al metabolismo de la glucosa, como para el eficiente control de la homeostasis del pH; a largo plazo, las V-ATPasas parecen estar implicadas en la localización estable del Pma1p en la membrana plasmática (328). El Pma1p es una bomba de protones tipo P localizada en la membrana plasmática y encargado del control del pH. Al igual que las V-ATPasas, son bombas electrogénicas que utiliza la hidrólisis del ATP para expulsar protones fuera del citosol (328).

La fuerza motivada por Na⁺, producida por la ATPasa Na⁺/K⁺, fue ampliamente reconocida como el principal dador de energía de la membrana plasmática en las células animales. Recientemente se ha descubierto que las V-ATPasas son más importantes que las Na⁺/K⁺-ATPasas para proporcionar energía a las membranas plasmáticas animales (315).

II.4.3. ESTRUCTURA Y REGULACIÓN DE LAS V-ATPASAS. SUBUNIDAD C

La bomba de protones tipo V-ATPasa presenta múltiples subunidades e isoformas de cada una de ellas, por eso es fundamental establecer un protocolo claro y unánime para su nomenclatura. En los inicios, se aceptó la denominación por parte del comité de nomenclatura de genes HUGO (HGNC) del símbolo ATP como raíz base. ATP6 indicaba ATPasa, transporte de H⁺, lisosomal (bomba de protones vacuolar).

En 2003, se realiza una revisión sobre la nomenclatura de los genes que codifican las subunidades de las V-ATPasas. La revisión concluyó en mantener la raíz ATP6, incluyendo el dominio al que pertenece la subunidad seguido de la letra de la misma y finalmente el número de la isoforma si procede (por ejemplo: *ATP6V1C1*, *ATP6V1E*, etc.) (329).

La estructura, función, biogénesis y regulación de las V-ATPasas ha sido ampliamente revisada por Stevens y Forgac (301), por lo que explicaremos las subunidades estructurales de V-ATPasa según la nomenclatura propuesta por dichos autores con modificaciones aportadas por investigaciones actuales en cuanto a la estructura observada al microscopio electrónico de transmisión (330).

Se ha visto que las V-ATPasas son casi idénticas en la composición de sus subunidades en todas las células eucarióticas. Están compuestas por dos estructuras distintas: un sector catalítico periférico (V1) y un sector de membrana hidrofóbico (V0) encargado de la conducción de protones (25). El sector catalítico está compuesto por 5 polipéptidos diferentes conocidos como subunidades A, B, C, D y E en orden decreciente, por el peso molecular de 72 a 33kDa, respectivamente. Recientes avances en el conocimiento acerca del mecanismo de acción de las F-ATPasas han clarificado las relaciones entre la función y la estructura de cada una de las subunidades individuales de las enzimas (331,332) (Figura 13).

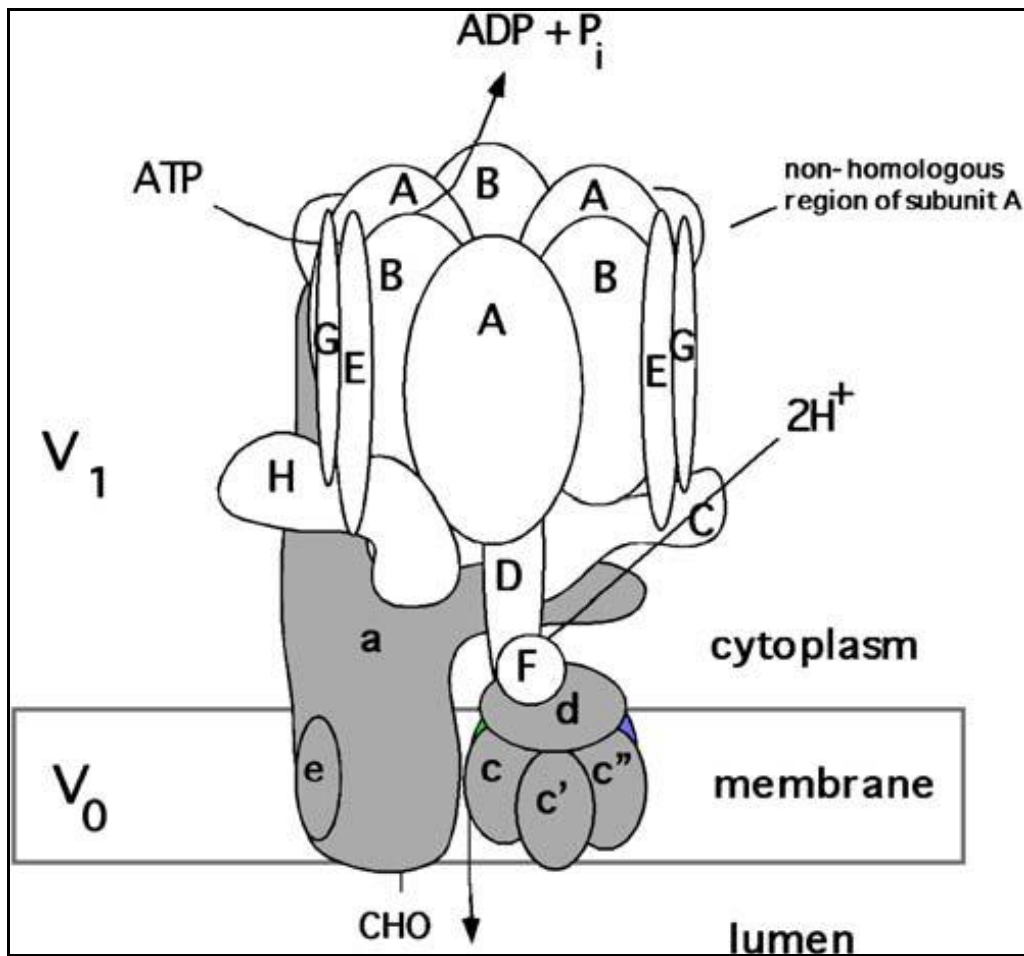


Figura 13. Modelo estructural de V-ATPasa compuesta por un dominio periférico (V1), responsable de la hidrólisis del ATP y un dominio integral (V0), encargado del transporte de protones. V1 y V0 están conectados por un tallo central (compuestos por las subunidades D y F en V1 y por la subunidad d en V0) y un tallo periférico (compuesto por las subunidades C, E, G, H y el dominio N-terminal de la subunidad a) (331).

A cada subunidad de la V-ATPasa se le asigna de una a cuatro partes de un complejo mecanoquímico (315) (Figura 14):

- 1.-Unidad catalítica
- 2.-Tronco o tallo
- 3.-Gancho
- 4.-Turbina

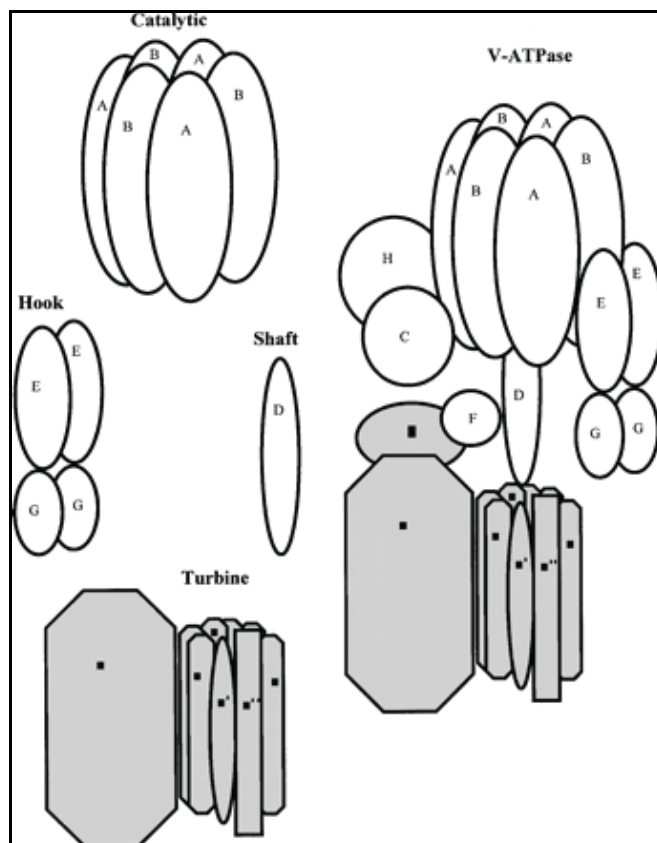


Figura 14. Subunidades estructurales de V-ATPasa. Distribución de varias subunidades en cuatro partes funcionales de la enzima: *Catalytic*: unidad catalítica; *Shaft*: tronco o tallo; *Hook*: gancho; *Turbine*: turbina (301).

La función principal del sector catalítico es unir ATP y catalizar la hidrólisis de ATP, mientras que la función principal del sector membranoso es conducir protones a través de la membrana. La energía de estos dos procesos es capaz de catalizar cambios conformacionales inducidos por la vía mecanoquímica (315).

De acuerdo con este concepto, Paul Boyer propuso hace dos décadas que la hidrólisis catalizada por las subunidades alfa y beta de F-ATPasa, inducen un momento de rotación en el tallo que rotará la turbina y las bombas de protones a través de la membrana. El gancho previene la rotación de la unidad catalítica (333).

A continuación, analizaremos la estructura y función de las subunidades individualmente (315):

1.-Subunidades catalíticas

1.1.- Subunidad A: peso molecular de 68 kDa. Su función es unir ATP y catalizar su hidrólisis.

1.2.- Subunidad B: tiene un peso molecular de 57 kDa. Funciona como una subunidad reguladora que contiene el sitio de unión de ATP y además, podría contribuir como remanente importante para la función catalítica de la subunidad A.

2.-Tallo o tronco

2.1.- Subunidad D: peso molecular de 28kDa. Podría jugar un papel importante en la unión entre la hidrólisis de ATP y el bombeo de protones. Esta subunidad se comporta como el tallo rotatorio que adquiere su momento de rotación de cambios conformacionales en la subunidad A y da el torque a la turbina y los protones en el sector de membrana. Estudios recientes, afirman que es imprescindible para el desarrollo embrionario (334).

3.-Gancho

3.1.- Subunidad E: peso molecular de 27 kDa. La estructura de esta subunidad contiene alfa-hélices alongadas, por lo que se ha sugerido que podría ser una parte del tallo. Aunque hoy día se propone que el estatus funcional de la subunidad E sea en el gancho, que era considerado en el pasado parte del tallo.

3.2.- Subunidad G: su peso molecular es de 13 kDa. Esta subunidad presenta una homología significativa con la subunidad b de las F-ATPasas. Puesto que la subunidad b es una parte de F₀ y funciona como un gancho que previene la rotación de las subunidades catalíticas. Se ha sugerido que la subunidad G puede tener una función similar en las V-ATPasas actuando como parte del gancho durante la reacción catalítica.

4.-Turbina

4.1.- Subunidad C: peso molecular de 40 kDa. Se cree que es la principal subunidad relacionada con la translocación de protones a través de la membrana y otras funciones biológicas que desarrollaremos a continuación.

4.2.- Subunidades c' y c'': peso molecular de 17 y 19 kDa respectivamente. Cada una de estas subunidades parece ser esencial para la actividad de la enzima.

4.3.- Subunidad A: peso molecular de 95 kDa. Una copia de esta subunidad es necesaria para la actividad y/o el armazón de la enzima.

4.4.- Subunidad d: peso molecular de 16 kDa. Se asocia periféricamente con el sector de membrana V0 en la cara citosólica de la membrana, pero contiene un segmento transmembrana no aparente.

5.-Otras subunidades

5.1.- Subunidad F: peso molecular de 14 kDa. La inhibición de la actividad de ATPasa (la hidrólisis de ATP y el transporte de protones) puede producirse por anticuerpos específicos para esta subunidad.

5.2.- Subunidad H: peso molecular de 54kDa. Esta subunidad es probable que funcione en la regulación de la actividad de la enzima y en la comunicación entre la V-ATPasa y las proteínas conectadas con otros procesos celulares.

En la Figura 15, podemos observar resumidas, la estructura, función y regulación de las distintas subunidades de la V-ATPasa (335).

Las interacciones entre las distintas subunidades son fundamentales para el correcto funcionamiento de las V-ATPasas (336). Así Jones et al., afirman que las subunidades C (Vma5p) y G (Vma10p), son capaces de interactuar fuertemente con la subunidad E (Vma4p). El extremo N-terminal de la subunidad E parece ser la llave no sólo de la regulación de la estructura molecular rotatoria de la V-ATPasa, sino también de las

interacciones con posibles subunidades reguladoras (337). Según Jefferies et al., la interacción de la subunidad H del dominio V1 libre con la subunidad F (subunidad de la parte rotatoria), permite la inhibición de la capacidad ATP-catalítica de la V-ATPasa (338).

Domain	Subunit	Encoding gene	Chromosome	Molecular weight (kDa)	Yeast gene	Function	Interacting protein
V ₁	A	ATP6A ₁ ATP6A ₂	3p13-q13.2	70-73	VMA1	ATP hydrolysis NEM/NBD-Cl binding site	
	B	ATP6B ₁ ATP6B ₂	2cen-q13 8p22-p21	56-58	VMA2	ATP binding	
	C	ATP6C	8p22-q21.3	40-42	VMA5	activity, V ₁ -V ₀ assembly	
	D	ATP6M	14	34	VMA8	activity, assembly	
	E	ATP6E	22q11.1	31-33	VMA4	activity, assembly	mSos, aldolase
	F	ATP6S14	12	14	VMA7	activity, V ₁ -V ₀ assembly	
	G	ATP6G	6p21	13-15	VMA10	activity, assembly	
	H			50-54	VMA13	activity	HIV-1 Nef
V ₀	a	ATP6N	17q21	100-116	VPH1/STV1	proton translocation bafilomycin-binding site	
	c	ATP6L	16p13.3	17	VMA3	proton translocation bafilomycin/DCCD-binding site	E5 oncoprotein β_1 integrin
	c'			17	VMA11	proton translocation	
	c''	ATP6F	1p32.3	19	VMA16	proton translocation	
	d	ATP6N2		38	VMA6	activity, assembly	

Figura 15. Estructura, función y regulación de la V-ATPasa humana (335).

Otra clasificación de las subunidades de la V-ATPasa es la propuesta por Nishi et al., que las divide en función del dominio al que pertenecen (303) (Figura 16).

En cuanto a la **regulación de la V-ATPasa**, existen tres mecanismos diferentes. El *primero* es el control de la densidad de bombas, mediante el cual permite a las diferentes células mantener su pH citoplasmático y vacuolar estable. El *segundo* es mediante el control de la asociación/disociación de los dominios V1 y V0, como por ejemplo cuando se produce un descenso en los niveles de glucosa el cual genera una disociación del 70 % de los dominios V1 de la membrana. El *tercer* mecanismo de regulación es el control de la actividad secretora, mediante el equilibrio en la formación de bisulfito y la eficiencia en la unión de los H⁺ a la bomba. *Otros mecanismos* incluyen las modificaciones en el potencial de membrana necesario para la génesis del impulso electrogénico (302,339) y las alteraciones del complejo Vtc (chaperoninas de

transporte vacuolar), las cuales afectan a la conformación del dominio V0 y a la función de éste en la fusión vacuolar de la membrana (317).

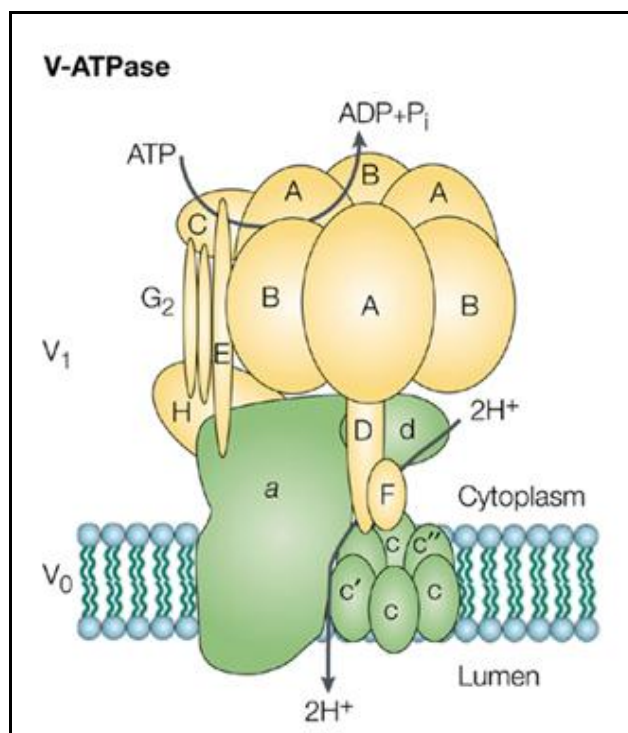


Figura 16. Esquema que representa la V-ATPasa. El dominio citosólico V1 (en amarillo), está formado por tres subunidades A, tres subunidades B, dos subunidades G y una subunidad de los tipos C, D, E, F y H. El dominio transmembrana V0 está formado por cinco subunidades diferentes: a, c, c', c'' y d. El dominio V1 contiene la unidad catalítica (303).

SUBUNIDAD C

La subunidad C, es la proteína de 40 kDa que está localizada en el dominio V1 de la V-ATPasa. Las novedosas técnicas de imagen como por ejemplo el SAXS (*small angle x-ray scattering*), pueden proporcionar información sobre la forma y la distribución de tamaños de poros, la densidad electrónica y la dimensión fractal que caracteriza a una superficie. Mediante esta técnica podemos describir la estructura y morfología de la subunidad C y su implicación en la regulación de las V-ATPasas (340,341) (Figura 17).

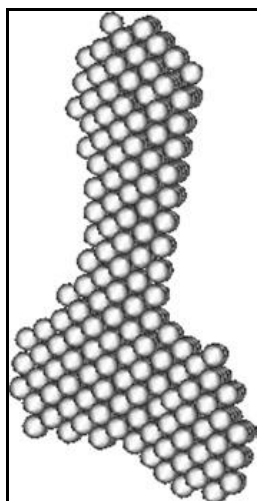


Figura 17. Estructura de la subunidad C de la V-ATPasa a baja resolución, con la técnica de SAXS (small-angle X-Ray scattering) (25).

Mediante microscopía inmuno electrónica, podemos determinar la localización y distribución espacial de las distintas subunidades, en este caso de la subunidad C (342,343) (Figura 18). El modelo propuesto por Zhang et al., coincide con el propuesto por Drory et al., donde establecen que la estructura cristalina de la subunidad C está formada por dos dominios globulares unidos por una conexión flexible (344) (Figura 19).

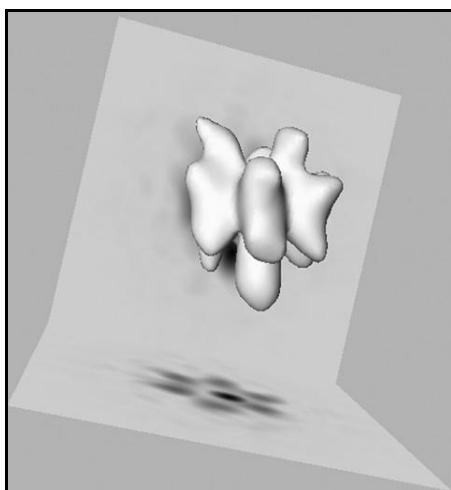


Figura 18. Estructura de la V1-ATPasa sin subunidad C, determinada mediante microscopía electrónica tridimensional de partículas simples. Se puede observar el cambio conformacional de la masa central de la V-ATPasa (25).

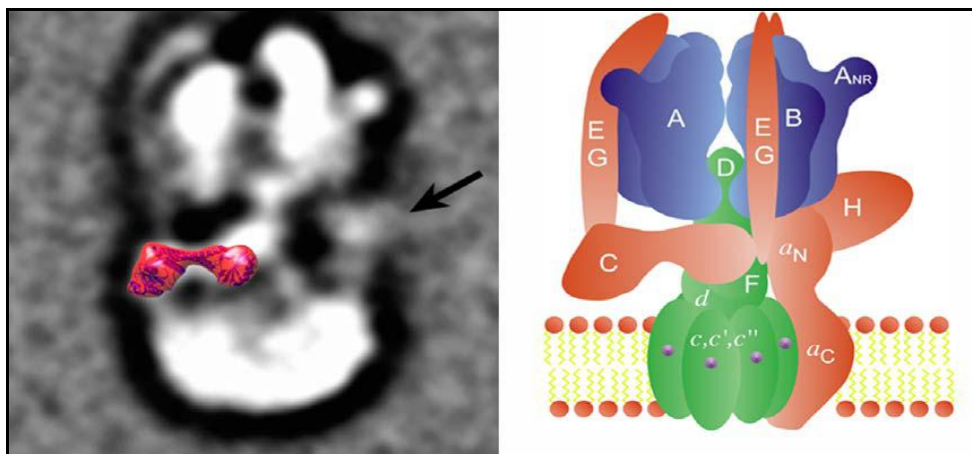


Figura 19. Imagen de la estructura cristalográfica de la subunidad C y modelo esquemático de trabajo (342).

Inoue y Forgac además de establecer la estructura cristalina de la subunidad C y su importancia en la disociación reversible como mecanismo de control de la actividad de la V-ATPasa, describen las relaciones de ésta con la subunidad E y G del dominio V1 y la subunidad a del dominio V0, estableciendo la importancia de la subunidad C como máxima responsable del control enzimático (27,28) (Figura 20).

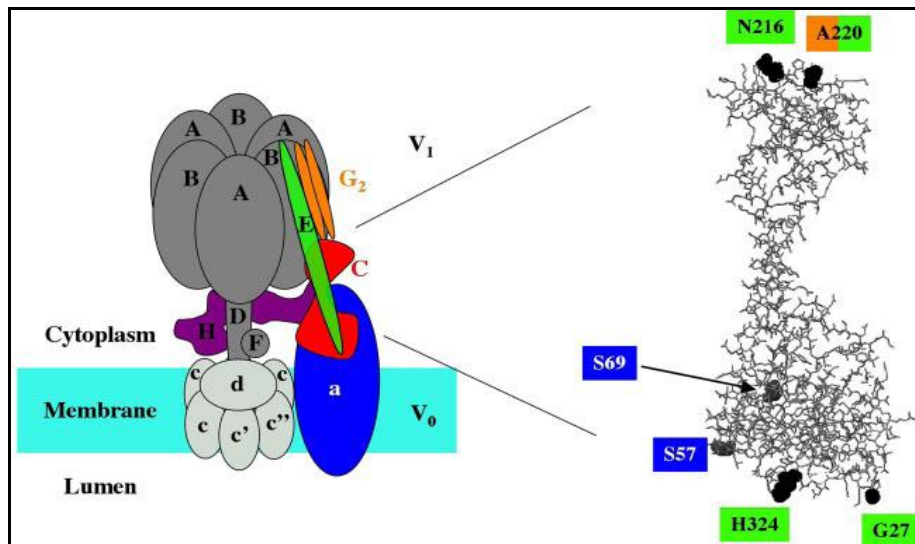


Figura 20. Modelo estructural de la subunidad C, dónde se muestra su localización y puntos de ensamblaje con las subunidades E, G y a y la localización de la subunidad C en el modelo completo de V-ATPasa. *Panel derecho:* modelo estructural de la subunidad C dónde se muestran los residuos de cisteína en los que se ensambla a las subunidades E (verde), G (naranja) y a (azul). *Panel izquierdo:* localización de la subunidad C en el modelo estructural del complejo V-ATPasa donde se muestra los contactos identificados entre las distintas subunidades (27).

La subunidad C, forma un complejo con la subunidad E necesario para la actividad Ca-ATPasa de V1 (301,339,345).

En un modelo experimental Peng et al., demuestran que la subunidad C es esencial para la función secretora de protones de las V-ATPasas, ya que en ausencia de dicha subunidad la hidrólisis de ATP está bloqueada (339). Mediante fotoafinidad y espectroscopia de correlación fluorescente, Armbrüster et al., demuestran que la subunidad C presenta más afinidad por las moléculas análogas del ADP que por las análogas de ATP (26).

Para muchos autores, la función más importante de la subunidad C es el control de la disociación reversible. Según Grüber et al., la subunidad C está íntimamente implicada en la disociación reversible de los dominios V1 y V0. La ocupación de ésta por nucleótidos y los cambios conformacionales en su estructura son los que permiten dicha disociación (25,26).

Inicialmente Puopolo et al., afirman que durante la formación del complejo V1V0, la subunidad C acelera el proceso pero no es indispensable (345), aunque estos resultados son discutidos en otros estudios de la época que defienden la hipótesis de la subunidad C como única reguladora del mecanismo disociativo (346). Esta teoría se ve apoyada por Drory et al., que afirman que la subunidad C es la única encargada de la disociación *in vivo* de la V-ATPasa (344).

Según Voss et al., la subunidad C es la encargada de producir la disociación de la V-ATPasa en los complejos V1 citosólico y V0 membranoso, mediante la interacción con la proteína quinasa A. Parece que la subunidad C puede ser fosforilada como parte del complejo V1 pero no como parte de la holoenzima V1V0. Ambas, la fosforilada y la no fosforilada son capaces de reasociarse con el complejo V1 del que habían sido removidas con anterioridad. Estos datos sugieren que la subunidad C sirve de sustrato a la proteína quinasa A y que su fosforilación puede ser el mecanismo principal de formación de la holoenzima activa V1V0 (347).

Otro mecanismo de disociación reversible regulado por la subunidad C es en el que la separación de la holoenzima V1V0 en subcomplejos V1 y V0, se realiza a través de la

unión de ésta y la F-actina próxima a la membrana basal de las células epiteliales. Parece que la subunidad C, actúa como una proteína de anclaje permitiendo el enlace entre la V-ATPasa y el citoesqueleto actina (29).

Sin embargo, según Izumi et al., las regiones promotoras comprendidas entre -79 y -40 del gen promotor ATP6C (subunidad c del dominio V0) y las comprendidas entre -245 y -99 del promotor ATP6F (subunidad F del dominio V1) son las más importantes para la actividad promotora basal, reguladas por la familia de factores de transcripción Sp y por lo tanto las más sensibles a posibles alteraciones. Parece que la explicación reside en la riqueza de la región proximal de dichos promotores en elementos cis-actin, necesarios para la expresión de los genes en las células cancerosas. La actuación en estos puntos podría ser clave para el bloqueo de dichas subunidades y poder regular la carcinogenesis (348).

Según Otero et al., la subunidad C1 de las V-ATPasas es la encargada de permitir el ensamblaje del componente membranoso V0 y el componente catalítico citosólico V1 (11) (Figura 21). Para el perfecto ensamblaje de la subunidad C1 a la V-ATPasa es esencial la presencia del complejo RAVE (regulador de las V-ATPasas y membranas endosomales) (28,349).

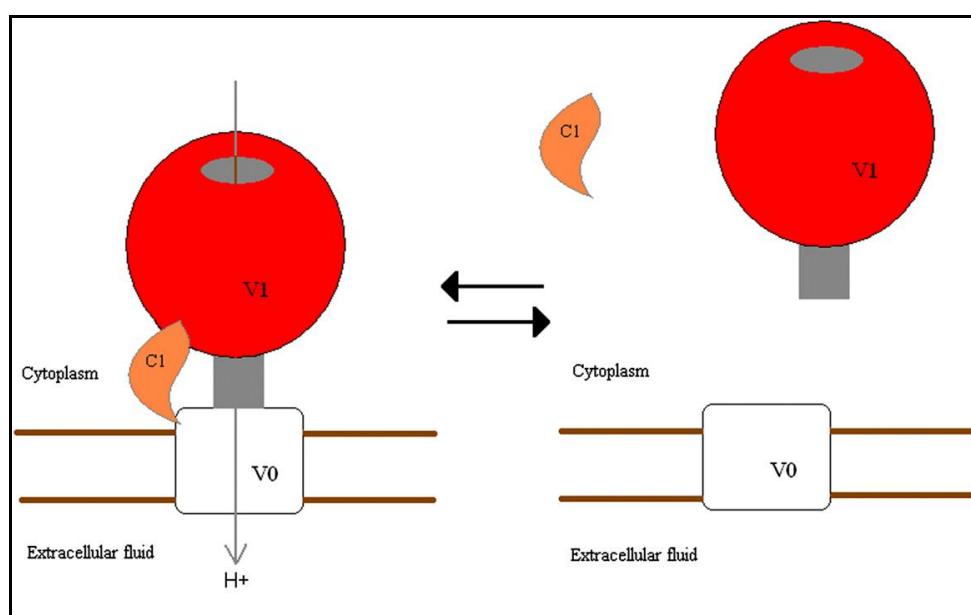


Figura 21. La disociación de la V-ATPasa en los componentes V1 y V0 está regulada por la subunidad C1 (11).

Smardon et al., hallaron *in vitro*, que en ausencia de subunidad C, se producía el ensamblaje de los dos dominios, pero el complejo V1V0 era altamente inestable y la actividad de la V-ATPasa extremadamente baja, lo que sugiere la exclusividad de la subunidad C en la regulación del ensamblaje del complejo V1V0 (349). De la misma manera, en ausencia de RAVE, la subunidad C es incapaz de ensamblarse a la V-ATPasa y por lo tanto la actividad enzimática queda anulada (349).

Estos datos están avalados por el estudio de Keenan et al., que encuentran una reducción de la actividad catalítica por encima del 48 % sin afectar al ensamblaje de la enzima en modelos experimentales con diferentes mutaciones en el gen de la subunidad C (350).

II.4.4. ATP6V1C1 (*ATPASE, H⁺ TRANSPORTING, LYSOSOMAL 42KDA, VI SUBUNIT C, ISOFORM 1*)

Este gen, también conocido como *VATC*, *Vma5*, *ATP6C*, *ATP6D* ó *FLJ20057* y EC 3.6.3.14, se localiza en el brazo largo del cromosoma 8 en posición 22 (8q22.3) (27,344,351,352) (Figura 22). Codifica un componente vacuolar de la ATPasa (V-ATPasa), una multisubunidad enzimática que media la acidificación de las organelas intracelulares eucarióticas (353).

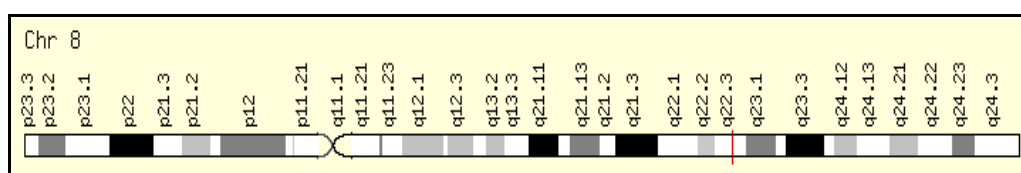


Figura 22. Representación esquemática de la localización del gen *ATP6V1C1* en el cromosoma 8.

Como hemos mencionado anteriormente, la acidificación de organelas dependientes de V-ATPasa es necesaria para procesos intracelulares como clasificación de proteínas, activación de zimógeno, endocitosis mediada por receptores y generación de un gradiente protónico de vesículas sinápticas.

V-ATPasa se compone de un dominio V1 citosólico y un dominio V0 transmembrana. El dominio V1 consiste en: 3 subunidades A y 3 subunidades B, 2 subunidades G y

subunidades C, D, E, F y H. El dominio V1 contiene el sitio catalítico de ATP y el dominio V0 consiste en 5 subunidades distintas: a, c, c', c'' y d. La subunidad C es análoga pero no homóloga a la gamma subunidad de las F-ATPasas (303).

Dos variantes de transcripción alternativas que codifican distintas isoformas se han encontrado en este gen, *ATP6V1C1* y *ATP6V1C2a* y *b* (Figura 23). Según Smith et al., *ATP6V1C2a* y *ATP6V1C2b*, aparecen en pulmón, riñón y epidídimo con la función de unión a la actina (354).

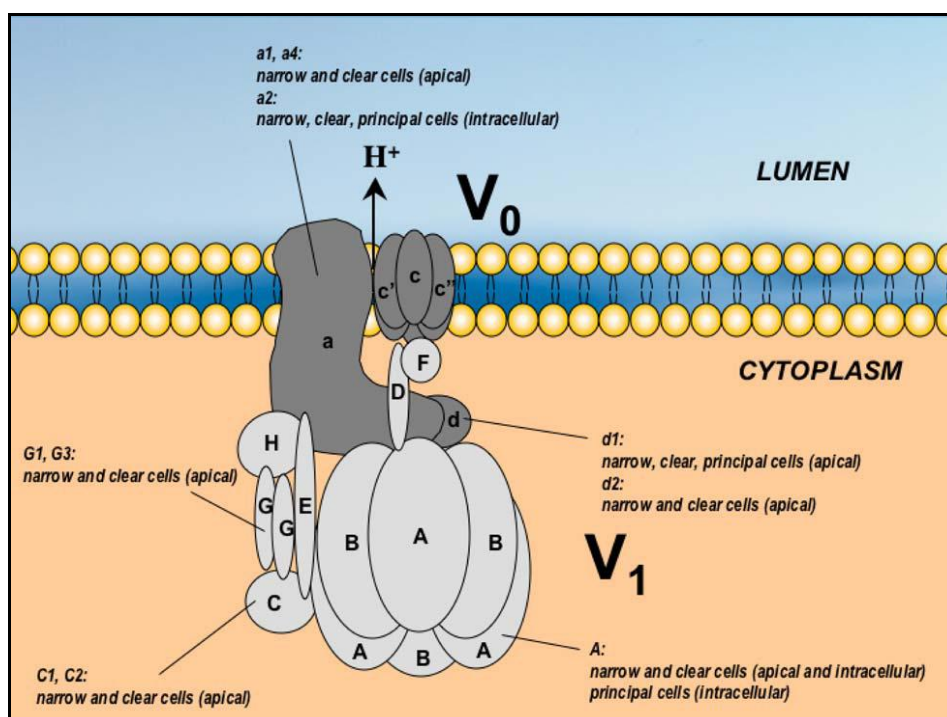


Figura 23. Expresión de las diferentes isoformas de las distintas subunidades de la V-ATPasa en el epidídimo del ratón (352).

ATP6V1C1 se ha encontrado en librerías de ADNc del Proyecto de Anatomía del Genoma del Cáncer, perteneciente a diversos tipos de tejidos: corteza suprarrenal, células B, hueso, médula ósea, encéfalo, cartílago, cerebro, cuello uterino, colon, oído, tejido endocrino, ojo, feto, tracto gastrointestinal y genitourinario, célula germinal, cabeza y cuello, corazón, riñón, hígado, pulmón, nódulo linfático, tejido linforreticular, glándula mamaria, músculo, nervios, ovarios, páncreas, islotes pancreáticos, sistema nervioso periférico, glándula pineal, glándula pituitaria, placenta, combinación de

distintos tejidos, próstata, glándula salival, piel, bazo, célula madre, estómago, célula T, testículo, timo, tejido no caracterizado, útero y tejido vascular (355).

En el Anexo I se muestra la información referente a este gen y su distribución en los distintos tejidos del organismo, según la base de datos del Proyecto de Anatomía del Genoma del Cáncer (355).

III.- MATERIAL Y MÉTODO

III.1. SELECCIÓN DE PACIENTES

El grupo caso está formado por 16 pacientes con COCE (diagnosticado histopatológicamente, tres de ellos con una lesión precancerosa asociada) del Servicio de Cirugía Maxilofacial del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, en el período de tiempo comprendido entre Septiembre de 2008 y Julio de 2009, que no han recibido tratamiento de quimioterapia ni radioterapia anteriormente. No se excluyó ningún caso de los diagnosticados en el periodo de estudio.

El grupo control está formado por 16 estudiantes voluntarios, de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela. Se les realiza una historia clínica y una exploración de la cavidad oral para confirmar la ausencia de patología oral. Se excluyen del grupo aquellos sujetos que presentaban alguna enfermedad sistémica o patología de la cavidad oral.

III.2. DATOS CLÍNICOS

De cada historia clínica se tienen en cuenta las siguientes variables: edad (en años), sexo (varón o mujer), consumo de tabaco, localización del tumor, estadio del tumor y diagnóstico anatómo-patológico (COCE positivo o negativo).

III.2.1.-Consumo de tabaco

Hay evidencias que sugieren que con el cese del hábito de fumar después de un período de 10 años, el riesgo elevado de cáncer se reduce a niveles cercanos a los de personas que nunca han fumado (62). Por este motivo, vamos a considerar como fumadores, a los pacientes que fuman desde hace más de 5 años consecutivos y a los exfumadores que abandonaron el hábito en un período menor o igual a 10 años. Se consideran exfumadores a los que abandonaron el hábito hace más de 10 años

III.2.2.- Localización del tumor

Se incluyeron las lesiones asentadas en las siguientes localizaciones: porción móvil de la lengua, base de la lengua, encía en todas sus localizaciones, suelo de boca, mejilla y triángulo retromolar.

III.2.3.- Estadío del tumor

Se han clasificado los tumores en función del estadio tumoral en el momento del diagnóstico, según la 5ª edición del Manual de Estadaje del Cáncer del *American Joint Committee on Cancer* (59).

III.3. SELECCIÓN DEL GEN A ESTUDIO

Como nos hemos referido anteriormente, partimos de un estudio previo realizado en nuestra unidad acerca del análisis de la expresión génica diferencial del COCE en relación a la mucosa oral normal, mediante *microarrays* de ADN, en muestras de biopsias (10). De los 426 genes que en este trabajo mostraron una expresión diferencial entre mucosa tumoral y mucosa normal, decidimos centrarnos en los genes sobreexpresados en el tejido tumoral. De los 322 genes sobreexpresados, se seleccionaron 6 de ellos que cumplieran una serie de parámetros estadísticos (*ADRBK2*, *ADRB1*, *ADRA2B*, *AXIN 2*, *ATP6V1C1* y *ATP6V0E*). Para su selección, se aplicó un método adicional de restricción estadística, el *z-score*, que permite eliminar aquellos genes con valores poco homogéneos entre las diferentes muestras. Los valores de restricción utilizados fueron: *z-score* >1 y *p* < 0.05 (116).

Para verificar la sobreexpresión de estos genes, se realiza PCR cuantitativa en tiempo real en 8 muestras de COCE, comparándolas con la mucosa normal de cada paciente. Entre los 6 genes seleccionados, el gen *ATP6V1C1* mostró una sobreexpresión en el 100 % de las muestras (11). Además, *ATP6V1C1* posee unas funciones biológicas muy importantes, al estar considerado como uno de los máximos responsables en el control de las V-ATPasas. Por todas estas razones y por su posible implicación en el COCE (en

el diagnóstico, el desarrollo o como posible marcador de evolución o de *screening*), hemos seleccionado *ATP6VIC1* como marcador tumoral en muestras citológicas.

III.4. METODOLOGÍA DE TRABAJO

III.4.1.- OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

A cada sujeto se le practica una toma de muestra citológica, tanto en el grupo caso como control, realizada por el mismo profesional, para el análisis molecular de la expresión de *ATP6VIC1*. La toma citológica en los controles, se realiza con el instrumento Cytobrush (Medscand Medical, Madrid, España), mediante un raspado vigoroso con el cepillo sobre la mucosa yugal, rotando el cepillo entre 10-15 veces (Figura 24). En los pacientes con COCE, la toma se realiza con el mismo instrumento, directamente sobre la lesión. Para la obtención de las muestras citológicas, no fue necesaria la aplicación de anestesia tópica y los sujetos no mostraron disconfort con el instrumento empleado.

A todos los pacientes se les realiza una biopsia para confirmar histopatológicamente el diagnóstico clínico, siguiendo la técnica convencional. Con las muestras de biopsias, se realiza inmunohistoquímica de 8 de los tumores y 2 muestras de mucosa sana, para confirmar la expresión de la proteína ATPase C1 (subunidad C1), controlada por el gen *ATP6VIC1*, en las células epiteliales orales.

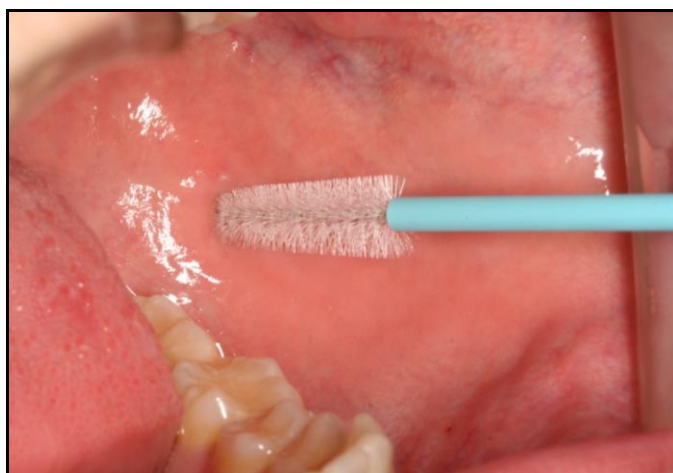


Figura 24. Toma de muestra citológica en controles mediante Cytobrush.

III.4.2. PROCESADO DE LAS MUESTRAS

III.4.2.1. Muestras para estudio inmunohistoquímico

Se valora la expresión de la subunidad C1 de la V-ATPasa, en 8 COCE y en 2 casos de mucosa normal contralateral. De los 8 COCE, 5 eran bien diferenciados (BD) y 3 indiferenciados (ID).

Tras la desparafinación se realiza el desenmascaramiento antigénico, para lo cual el tejido se trata con una solución de tampón citrato al 0,01 M. Todas las secciones se incuban durante 5 min con 0,03% de peróxido de hidrógeno a temperatura ambiente y 5 minutos con seroalbúmina (BSA). Las muestras se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo policlonal V-ATPasa C1 (clon H-300) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, C.A., U.S.A.) a una dilución 1:50.

La tinción inmunohistoquímica se desarrolla con el sistema de visualización Novolin Polymer Detection System (Novocastra Leica Microsystems Inc., Bannockburn, U.S.A.). Se utilizan controles negativos omitiendo el anticuerpo primario. Las secciones se revelan con 3,3'-diaminobencidina (DAB) y los núcleos se contratiñen con hematoxilina. Las secciones se analizan con un microscopio óptico Olympus BX41 (Leeds precision instruments, Minneapolis, U.S.A.) y el sistema de imagen DP-SOFT (Olympus Optical Co., Hamburg, Germany) (Figura 25).

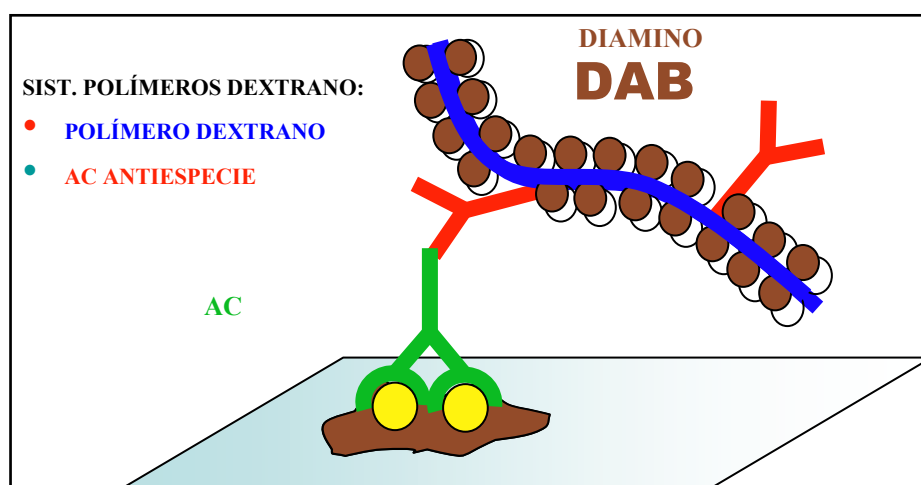


Figura 25. Esquema de funcionamiento del sistema de la DAB para detección de la subunidad C1.

La valoración de la expresión, se realiza por dos observadores de un modo independiente y totalmente descriptiva. Se valora la localización en las células epiteliales (nuclear, perinuclear y citoplasmática) y la intensidad (leve y moderada).

III.4.2.2. Muestras para estudio molecular con PCRq-RT

Las muestras obtenidas con el *Cytobrush* se utilizan para el estudio molecular, concretamente para el estudio del ARN obtenido mediante la citología exfoliativa. En este caso el medio de transporte y conservación de las muestras que usamos es el RPMI-1640 MEDIUM (Microvet, Madrid, España), formulado para mantener numerosas líneas celulares. Para su conservación debe de mantenerse entre 2-10°C y protegerlo de la exposición a la luz.

Para el análisis de la expresión de *ATP6VIC1*, las muestras siguen un proceso de extracción de ácidos nucleicos (ARN) y retrotranscripción para obtener ADNc. Todas las muestras son procesadas en el curso de 1 semana tras su obtención para evitar diferencias en cuanto al almacenamiento o bien debidas al estado de los productos empleados que pudieran alterar la relación de cantidad y calidad de material genético. Todo el experimento se realiza por duplicado.

El método que hemos utilizado implica el aislamiento de ARNm de cada muestra, preparación del ADNc mediante transcriptasa inversa y además la amplificación del ADNc específico de un gen que se expresa de forma constante en todos los tejidos (*housekeeping*). El gen seleccionado es el *ABL* (Abelson), también analizado mediante PCR a tiempo real.

Los pasos a seguir son los siguientes:

1. Extracción del ARN total

Para la extracción del ARN total se procede inicialmente a una centrifugación a 12000 rpm durante 1 minuto de las muestras. Tras desechar el sobrenadante, el pellet de células se procesó con el kit RNeasy minikit (Quiagen, Hilden, Alemania) siguiendo el

protocolo del fabricante. El procedimiento se basa en la retención en membrana del ARN y posterior elución. La integridad del ARN se comprueba mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

2. Retrotranscripción

El ARN obtenido se convierte en ADNc mediante la reacción de retrotranscripción, empleando la transcriptasa reversa AMV (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y "random primers" (Roche). La reacción se realiza en un volumen final de 20 microL siguiendo el protocolo especificado por el fabricante. La mezcla se incuba a 37°C durante una hora y tras la desnaturalización de la transcriptasa a 65°C durante 10 minutos, el cADN obtenido se almacena a -20°C hasta su utilización.

La integridad y calidad del ADNc obtenido se analiza mediante la amplificación del gen *housekeeping ABL* empleando PCR en tiempo real, como se indica en el siguiente paso.

3. Cuantificación por tiempo real

Para el análisis de PCR, se mezclan 5µl de la reacción de transcripción inversa con 15µl de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA), conteniendo 250nM de los cebadores, junto con 125nM de la sonda TaqMan, específicos del gen *ABL* y del gen *ATP6VIC1* respectivamente. Los cebadores y sonda de ambos genes, fueron adquiridos a Applied Biosystems (TaqMan Gene Expression Assays, Foster City, Estados Unidos). Las mezclas provistas incluyen todos los reactivos necesarios salvo el ADNc de la muestra y funcionan con un protocolo único y común a todos.

El método está basado en la propiedad 5'-exonucleasa que posee la Taq polimerasa. La sonda TaqMan está marcada con un fluoróforo marcador en el extremo 5' (reporter) y otro fluoróforo en el extremo 3' (quencher) (Figura 26). Cuando la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el marcador es apantallada por el quencher de tal manera que no se observa fluorescencia alguna. Conforme se va produciendo la reacción PCR debido a la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa, se van liberando moléculas del fluoróforo marcador, lo que permite la emisión de fluorescencia. Dicha fluorescencia se mide con un equipo ABI 7300 (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems),

capaz de detectar los productos de PCR conforme se van acumulando durante la reacción, lo cual permite la cuantificación precisa y reproducible de DNA. Esta fluorescencia es proporcional al número de moléculas de DNA presentes en la muestra, es decir, a la expresión del gen de interés.

ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos) es un equipo de tiempo real que emplea placas de 96 pocillos. Durante la PCR la sonda taqman que hibrida con la secuencia diana, se rompe debido a la actividad 5' exonucleasa de la polimerasa, liberando el fluoróforo *reporter* (6-carboxi-fluoresceína, FAM) del *quencher* (6-carboxi-tetrametil-rodamina, TAMRA). Un láser excita los electrones de las moléculas del *reporter*, lo que se traduce en una emisión entre 500 y 600 nm que es capturada a través de cables de fibra óptica y focalizada en un detector. La señal es procesada y analizada por medio del *software* instalado en el equipo.

Las intensidades de las emisiones de las reacciones se miden secuencialmente cada pocos segundos, evaluándose la relación de intensidades entre los fluoróforos del *reporter* y del *quencher*. Dado que la intensidad del fluoróforo del *quencher* varía mínimamente durante la PCR, se puede emplear para normalizar las variaciones en la intensidad del *reporter*.

Las condiciones de PCR para ambos genes fueron las siguientes:

- 10 min a 95°C, para la activación del enzima.
- 40 ciclos de dos pasos: 15seg. a 95°C y 1min. a 60°C.

El ciclo en el que la intensidad de la emisión de una muestra sobrepasa la línea de base (ruido de fondo), se conoce como ciclo umbral (**Ct**, *threshold cycle*) y es inversamente proporcional a la concentración de secuencias diana de la sonda: a mayor concentración de ADNc diana, menor es el número de ciclos de amplificación requeridos para detectarla.

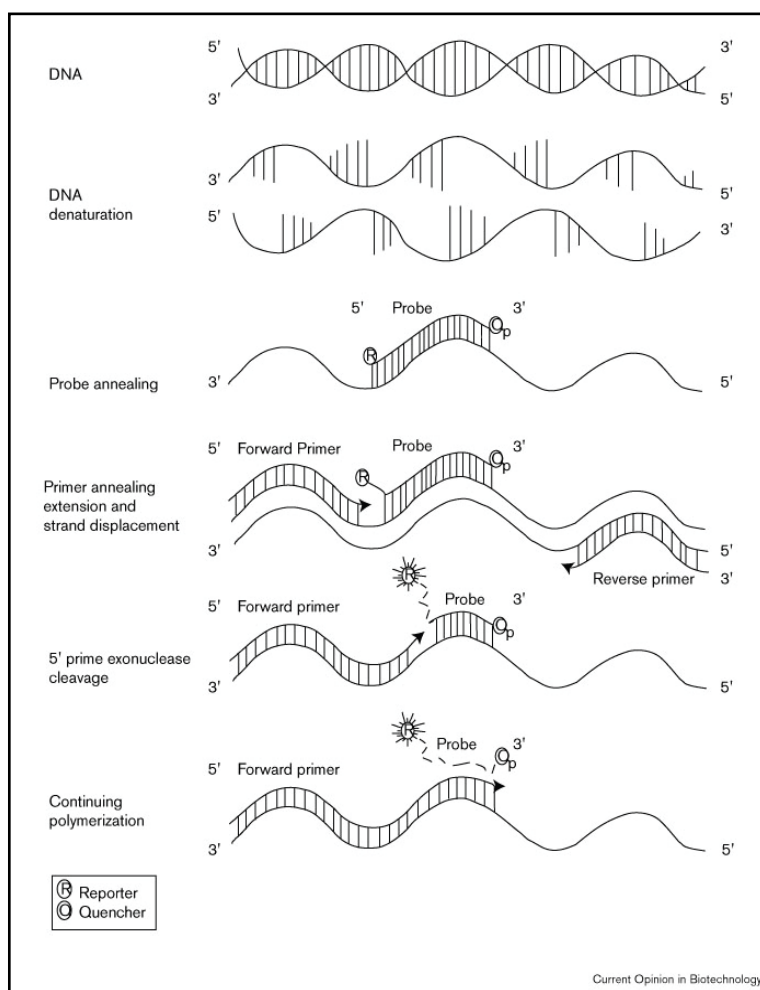


Figura 26. Cuantificación por PCR en tiempo real.

Todas las muestras se analizan por duplicado. Para la cuantificación del gen *ABL* se emplea una curva estándar comercial (ABL FusionQuant Standards, Ipsogen, New Haven USA). Para la cuantificación del gen *ATP6VIC1*, se construye una curva de calibrado mediante diluciones seriadas (1, 1/100, 1/1000, 1/10000) a partir de una muestra de un paciente control. Los valores para determinar el ciclo umbral (Ct) (porcentaje a partir del cual se obtiene respuesta) se miden con el sistema de PCR en tiempo real ABI 7300 empleándose el software instalado (7300 System SDS Software, Applied Biosystems) y se transforman en número de copias de *ABL* o de *APT6VIC1* utilizando las curvas estándar obtenidas el mismo día del experimento (Figuras 27 y 28).

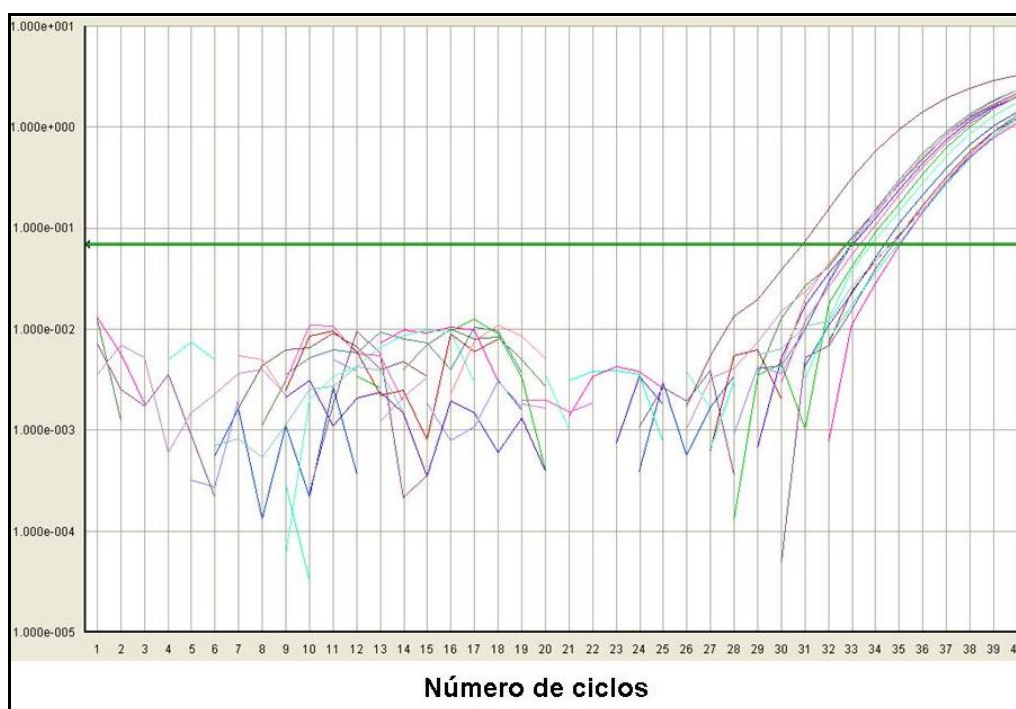


Figura 27. Gráfica correspondiente a la RT-qPCR para *ABL*, donde la línea horizontal verde se corresponde con el Ct: ciclo en el que la intensidad de la emisión de una muestra sobrepasa la línea de base (ruido de fondo).

Durante la PCR el *software* calcula un valor denominado Rn según la ecuación: **Rn = (Rn+) – (Rn-)**. Rn+ es la intensidad del *reporter* dividida por la intensidad del *quencher* en el ciclo n de la PCR, y Rn- es la intensidad del *reporter* dividida por la intensidad del *quencher* del ciclo n-1 previo de amplificación. Así, Rn representa la cantidad de sonda hibridada y rota por la actividad 5' nucleasa. Un valor de Rn se calcula por cada ciclo durante la fase de elongación y se representa contra el número de ciclos en un diagrama, generándose así una curva de amplificación (Figura 27).

4. Normalización de datos

Las curvas de expresión de cada gen se normalizan utilizando el gen *housekeeping* (*ABL*) que se expresa siempre y en una tasa constante en todas las células. Los resultados se expresan como la relación entre el número de copias de *ATP6VIC1* y el número de copias de *ABL*.

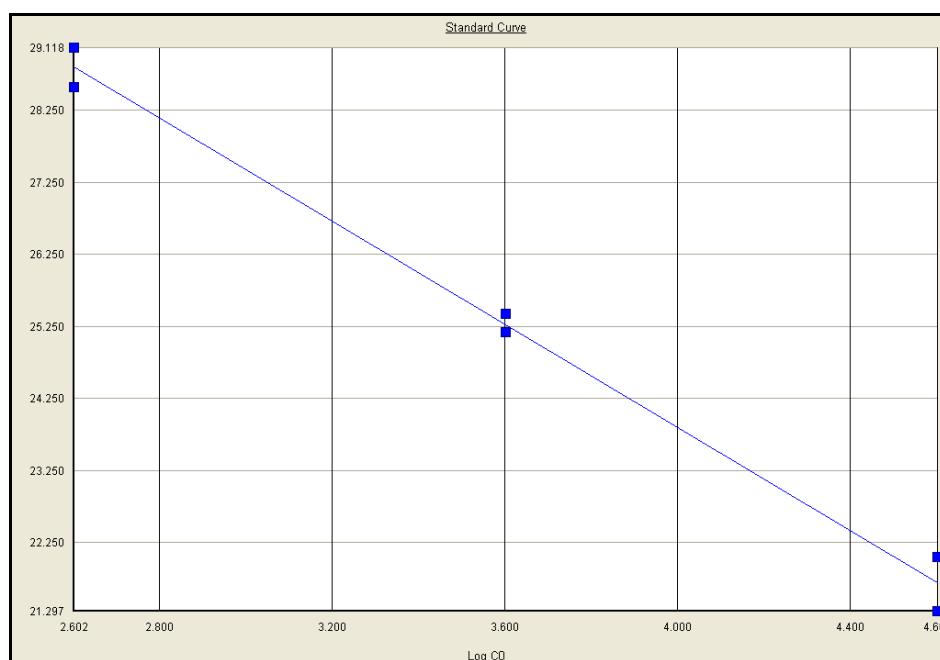


Figura 28. Recta de calibrado del gen *ABL*. El valor de r nos indica la calidad de la curva (su valor se comprende entre 0 y 1): cuanto más cercano sea a 1 la calidad de la curva es mayor.,

III.5. ANÁLISIS DEL NIVEL DE EXPRESIÓN

Con los valores correspondientes a la expresión en valor absoluto de *ATP6V1C1* a través de la PCRq-RT, obtenemos una medida real de la cantidad de RNA en las diferentes muestras, tanto en los casos como en los controles. El valor 0, indica que la expresión del gen es nula en la muestra obtenida.

III.6. ANALISIS ESTADÍSTICO

Se realizó la recogida de las variables de estudio en una base diseñada al efecto, con comprobación repetida de la calidad de los datos. Para el análisis se empleó el paquete de software STATA 11 (StataCorp LP, Texas, USA).

Descripción de la muestra. Para la descripción de las variables cuantitativas se emplea media o mediana y desviación estándar (SD) o rango intercuartílico. Para variables categóricas se emplea frecuencia y porcentaje.

Análisis univariante. Se utilizan las siguientes pruebas: para comparación de medias, la prueba U de Mann Whitney, la H de Kruskall Wallis o la prueba de Jonckheere-Terpstra según condiciones de aplicación; para comparación de proporciones, la prueba Ji cuadrado o la prueba exacta de Fisher según condiciones de aplicación.

Análisis de la capacidad predictiva de la expresión de *ATP6V1C1* en muestras de citología exfoliativa de mucosa bucal. Mediante el análisis de curvas ROC se analizaron los diferentes puntos de corte de los valores de expresión del gen, valorando los que presentaban mejor capacidad predictiva (área bajo la curva, AUC, más próxima a 1) (356,357). Para evaluar la validez de la prueba se estimó su sensibilidad y especificidad y para evaluar su seguridad, se estimaron los valores predictivos positivo y negativo. Se estimaron también las razones de verosimilitud positiva (RV +) y negativa (RV -) para analizar cuanto más probable es un resultado positivo o negativo en presencia o ausencia de COCE, respectivamente, según las siguientes fórmulas:

$$RV+ = \frac{\text{Sensibilidad}}{1 - \text{Especificidad}} \quad RV- = \frac{1 - \text{Sensibilidad}}{\text{Especificidad}}$$

III.7. ASPECTOS ÉTICOS

El presente estudio ha recibido el visto bueno del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia.

Los pacientes fueron informados de la naturaleza del estudio en el que iban a participar y dieron su autorización por escrito, firmando el correspondiente consentimiento informado, según el modelo detallado en el Anexo II.

En todo caso, no se recogieron datos que permitieran la identificación de las personas participantes, garantizando su confidencialidad.

IV.- RESULTADOS

IV.1. CARACTERISTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS

IV.1.1. DESCRIPTIVO

IV.1.1.1. Edad y sexo

En cuanto al grupo caso:

La edad media es de $65,69 \pm 12,01$, con un rango de 44-81 años.

De los 16 pacientes, 12 (75%) son hombres y 4 (25%) mujeres.

En cuanto al grupo control:

La edad media es de $26,88 \pm 3,37$, con un rango de 24-34 años.

De los 16 pacientes, 4 (25%) son hombres y 12 (75%) mujeres.

IV.1.1.2. Consumo de tabaco (Figura 29)

En cuanto al grupo caso:

De los 16 pacientes, 8 (50 %) son fumadores, 6 (37,5 %) no fumadores y 2 (12,5 %) exfumadores.

En cuanto al grupo control:

De los 16 pacientes, 7 (43,8 %) son fumadores, 9 (56,25 %) no fumadores y no hay exfumadores.

IV.1.1.3. Localización del tumor

En los 16 casos se trata de tumores primarios intraorales: 5 localizados en la lengua (31,3 %), 4 en encía (25 %), 2 en mejilla (12,5 %), 3 en suelo de boca (18,8 %) y 2 en trigono retromolar (12,5 %) (Tabla 2).

IV.1.1.4.- Estadío del tumor

En el momento del diagnóstico, 4 de los tumores están en estadio I (25 %), 2 en estadio II (12,5 %), 5 en estadio III (31,3 %) y 5 en estadio IV (31,3 %) (Figura 30).

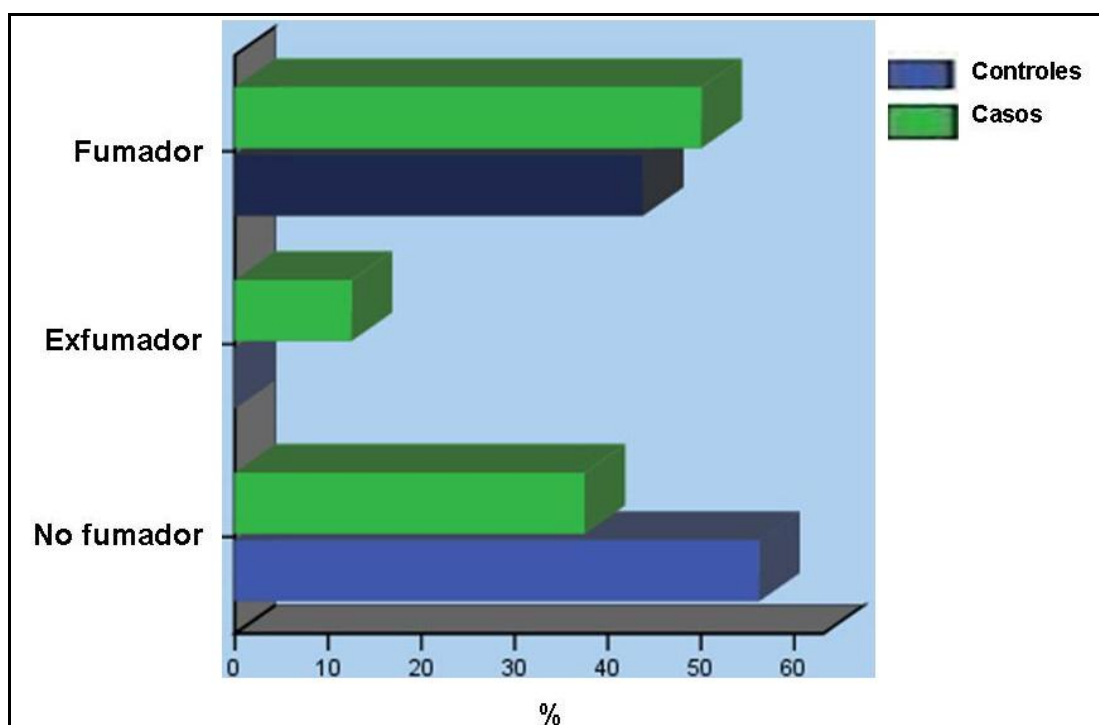


Figura 29. Distribución del consumo de tabaco en casos y controles.

LOCALIZACIÓN	Nº DE CASOS	%
Lengua	5	31,25
Encía	4	25
Mejilla	2	12,5
Suelo de boca	2	12,5
Trígono retromolar	2	12,5

Tabla 2. Localización del tumor primario

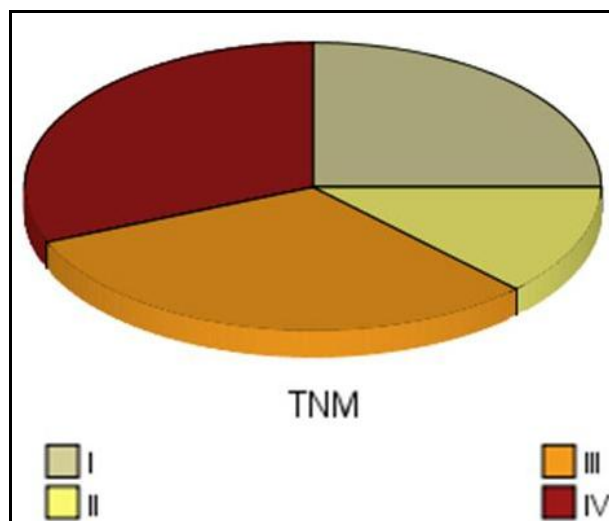


Figura 30. Distribución de los tumores, clasificados según el estadio TNM.

IV.1.2. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS

IV.1.2.1. Asociación entre casos/controles y sexo

La distribución según sexo muestra un mayor número de hombres (75 %) en el grupo de casos, mientras que en el grupo de los controles, existe una mayoría de mujeres (75 %). Estas diferencias son estadísticamente significativas (Chi-cuadrado de Pearson=16,00, $p<0,001$) (Figura 31).

IV.1.2.2. Distribución de hábito tabáquico según género en casos y controles.

En el total de la muestra estudiada, el 50 % de los varones son fumadores, mientras que en el caso de las mujeres, lo son el 43,8%. En cuanto a los exfumadores, todos son varones (100 %) (Figura 32).

IV.1.2.3. Asociación entre localización y estadio TNM

Observamos que los tumores en estadio I, se encuentran en la lengua un 50% y el resto en suelo de boca y trigono retromolar. En estadio II, el 50 % se localizan también en la

base de la lengua y el 50 % en mejilla. En estadio III, el 60 % se localiza en encía y el resto en menor porcentaje en suelo de boca y triángulo retromolar.

En cuanto a los tumores en estadio IV, la distribución es más homogénea, con un 20 % de tumores en cada una de las localizaciones (lengua, encía, mejilla y suelo de boca), excepto en el triángulo retromolar donde no se ha encontrado ningún caso (Figura 33).

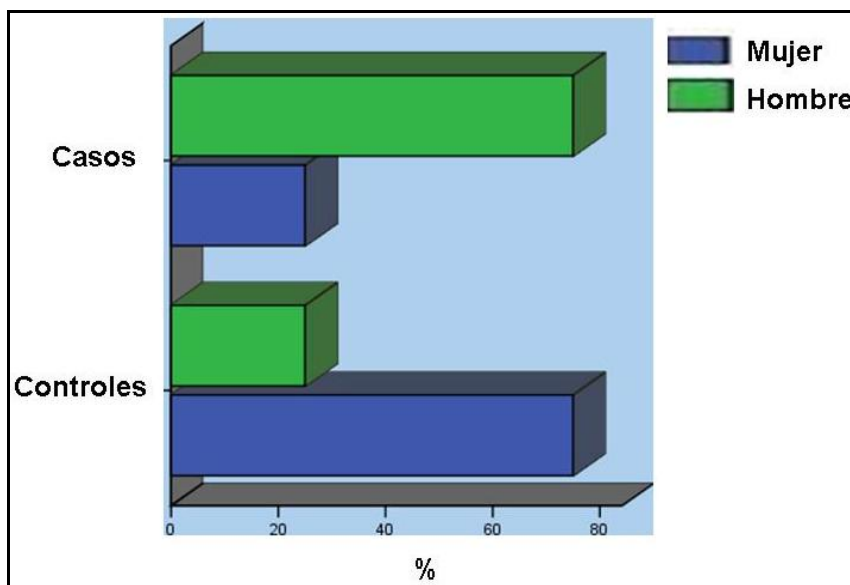


Figura 31. Distribución de los casos y los controles según el sexo. Observamos una clara simetría inversa entre las variables (Chi-cuadrado de Pearson=16,00, $p<0,001$).

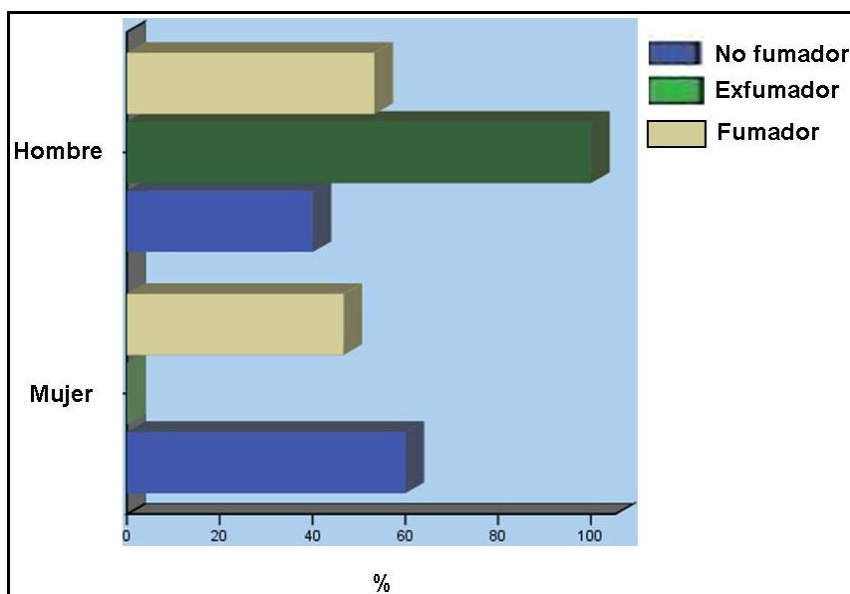


Figura 32. Distribución de hábito tabáquico según género en la totalidad de la muestra.

IV.1.2.4. Asociación entre hábito tabáquico y estadio TNM

Cuando analizamos los pacientes del grupo caso en relación al hábito tabáquico y estadio TNM, observamos que el 37,5 % de los fumadores se diagnostican en estadio I (n=6), el 12,5 % en estadio II (n=2), el 25 % en estadio III (n=4) y el 25 % restante en estadio IV (n=4). En cuanto a los pacientes no fumadores con COCE, la gran mayoría, el 66,6 % (n=8) se diagnostican en estadios III y IV. Respecto a los exfumadores, el 50 % se encuentran en estadio III y el 50 % en estadio IV. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Chi-cuadrado de Pearson=4,33, p=0,632) (Figura 34).

Agrupando los tumores en dos grupos según mejor (tumores en estadios I y II) o peor pronóstico (tumores en estadios III y IV), observamos que el 66,7 % de los no fumadores y el 100 % de los exfumadores, se encuentran en el segundo grupo. Mientras que el 50 % de los fumadores se incluyen en el primer grupo. Las diferencias no son estadísticamente significativas (Chi-cuadrado de Pearson=3,565, p=0,169).

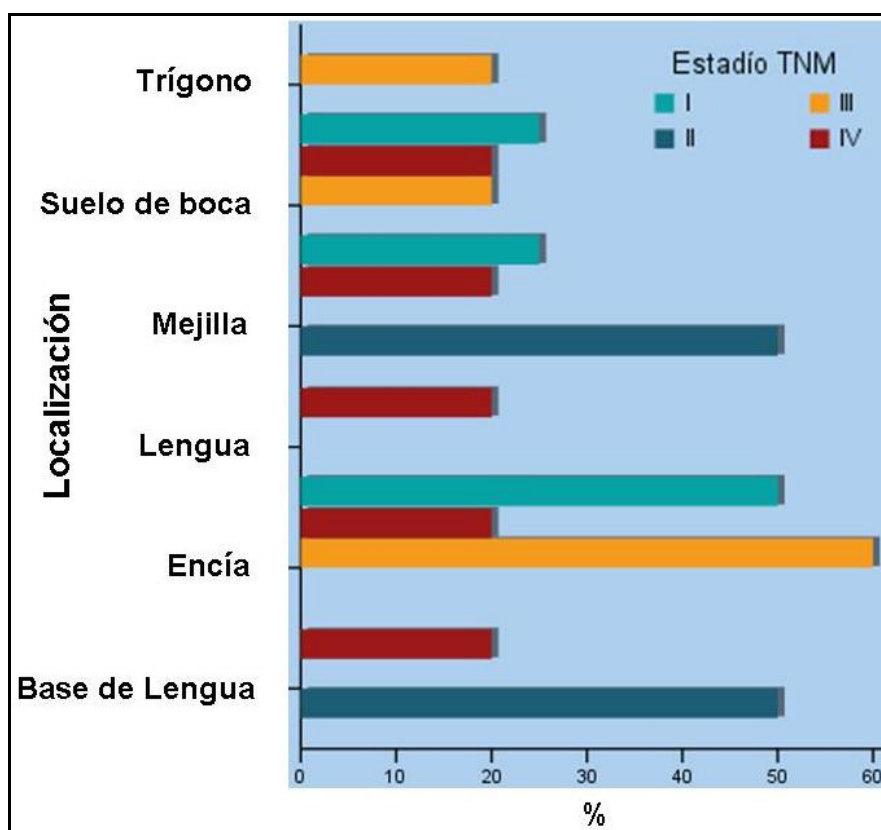


Figura 33. Distribución de los tumores en función de su localización y su estadio TNM.

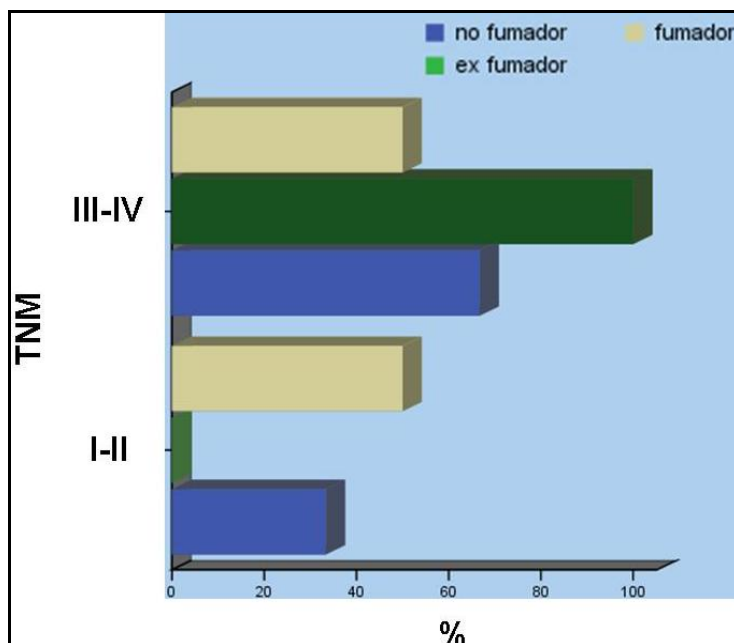


Figura 34. Distribución de los casos según hábito tabáquico y estadio TNM (Chi-cuadrado de Pearson=4,33, $p=0,632$).

IV.2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE *ATP6VIC1* MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA

En la mucosa oral normal se observa expresión de la subunidad C1 en los estratos basales e intermedios, con ausencia en los estratos superficiales queratinizados. El patrón de expresión es homogéneo y la intensidad leve (Figura 35). Se reconoce expresión en las células del estrato basal, con alguna célula con tinción nuclear, pero la mayoría presenta expresión citoplasmática. Las células positivas subepiteliales corresponden mayoritariamente a células endoteliales y a células histiocitarias (Figura 35).

En el COCE se reconoce una expresión más intensa que se dispone especialmente en la periferia de los nidos tumorales con ausencia en las zonas disqueratóticas (Figura 36). A mayor aumento se observa que la expresión en las células tumorales es principalmente citoplasmática (Figura 37). Todos los carcinomas presentaron tinción citoplasmática, en tres se reconocía expresión perinuclear y en dos nuclear. En relación con la intensidad la

expresión era leve en tres y moderada en los otros cinco. No hemos reconocido diferencias en relación con la diferenciación.

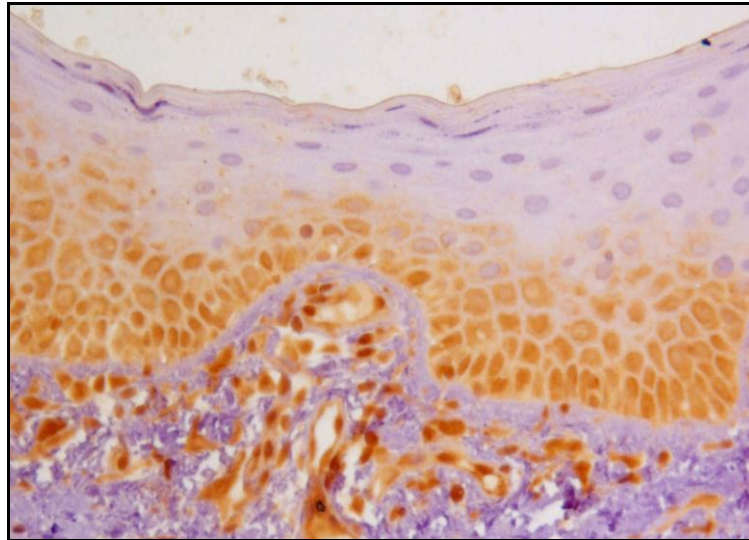


Figura 35. Mucosa normal. Expresión ATPasa C1 nuclear y citoplasmática leve en los estratos basales del epitelio (40X).

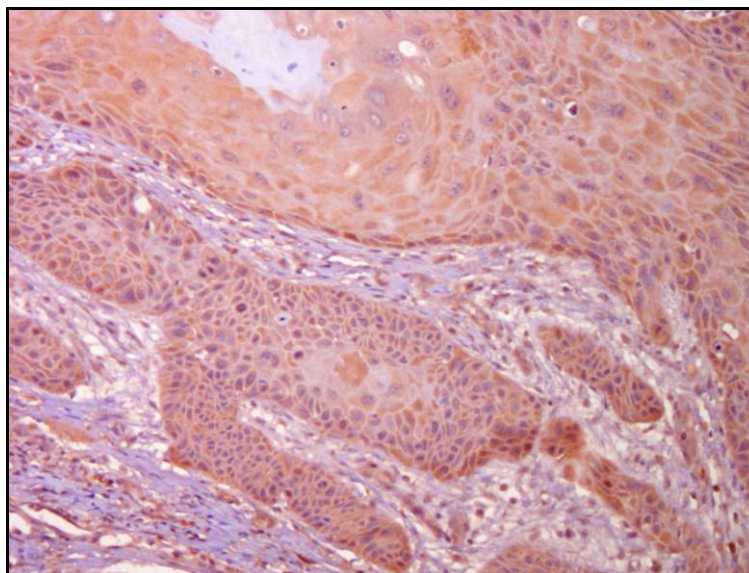


Figura 36. Expresión ATPasa C1 en un carcinoma oral bien diferenciado (20X).

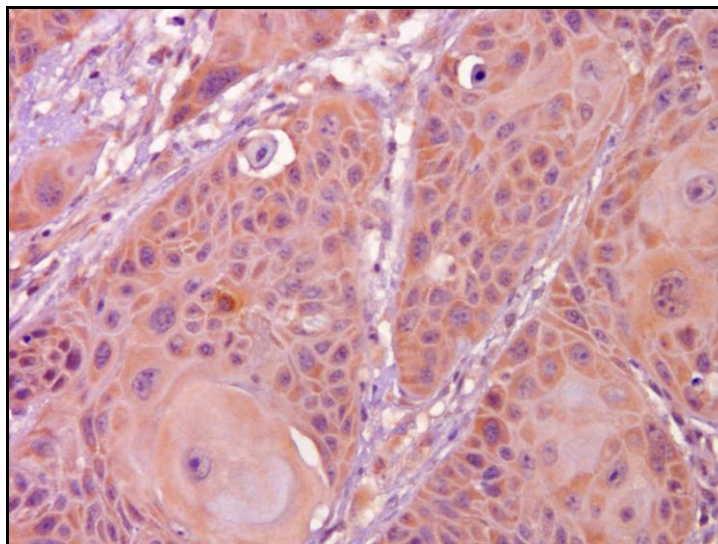


Figura 37. Expresión citoplasmática de ATPasa C1 en las células tumorales y ausencia en las áreas disqueratóticas (40X).

IV.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE *ATP6VIC1* MEDIANTE PCR-qRT

IV.3.1. Distribución de niveles de expresión de *ATP6VIC1*

IV.3.1.1 Expresión de *ATP6VIC1* en casos y controles

En el grupo caso, la expresión de *ATP6VIC1* es de $12,14 \pm 12,88$, con un rango de 0,46-56,01. Por su parte, en el grupo control, la expresión de *ATP6VIC1* es de $0,33 \pm 1,3$, con un rango de 0-6,77. Estas diferencias son estadísticamente significativas (U de Mann Whitney=26, $p < 0,001$) (Figuras 38 y 39).

Para estudiar su distribución en los casos, se ha estimado la expresión de *ATP6VIC1* por percentiles, como podemos observar en la Tabla 3, en la que se detallan los valores de los percentiles para la expresión de *ATP6VIC1*. Se observa un rango intercuartilico de 3,8 a 17.

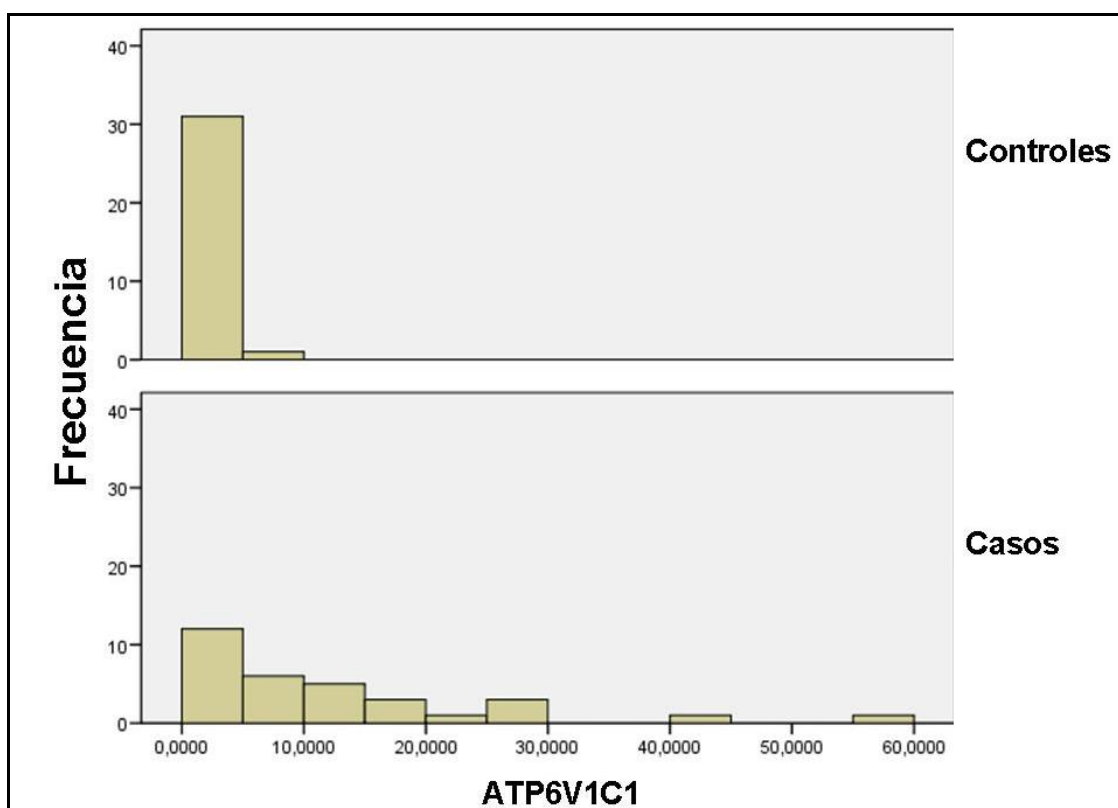


Figura 38. Valores de expresión de *ATP6V1C1* en casos y controles (U de Mann Whitney=26, $p<0,001$).

PERCENTIL	PROMEDIO DE EXPRESIÓN DE <i>ATP6V1C1</i>
5	0,51
10	0,65
25	3,38
50	7,38
75	17
90	28,96
95	46,59

Tabla 3. Expresión de *ATP6V1C1* en los casos con COCE, distribución en percentiles.

IV.3.1.2. Expresión de *ATP6VIC1* en el grupo caso en relación al sexo:

La media de expresión para las mujeres es de $20,07 \pm 17,94$ con un rango de 0,63-56,01 y para los varones de $9,50 \pm 9,83$ con un rango 0,46-41,52. Sin embargo, cuando se analiza la expresión de *ATP6VIC1* en cada estadio tumoral, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas según el sexo (Tabla 4).

TNM	N (%)	EXPRESIÓN DE <i>ATP6VIC1</i>	P
I			0.07
Varones	6 (75)	4.90	
Mujeres	2 (25)	0.66	
II			(*)
Varones	4 (100)	12.55	
Mujeres	0		
III			0.09
Varones	8 (80)	7.74	
Mujeres	2 (20)	22.46	
IV			0.17
Varones	6 (60)	14.41	
Mujeres	4 (40)	28.56	

(*) No procede

Tabla 4. Expresión de *ATP6VIC1* en los casos con COCE, distribución según sexo en cada estadio TNM.

La expresión de *ATP6VIC1* en los tumores en estadio IV, es la que presenta los valores más elevados.

Para los tumores en este estadio, la expresión de *ATP6VIC1* es de $14,41 \pm 14,3$ para los varones,

mientras que para las mujeres en el mismo estadio, es de $28,57 \pm 19,52$.

Por ello se identifica un efecto confusor del sexo respecto a la expresión de *ATP6VIC1*, dada la distribución de casos según sexo en cada estadio TNM. Mientras un 75 % de las mujeres, se encuentran en estadios tumorales III y IV, sólo un 58,3 % de los varones lo hace.

IV.3.1.3. Expresión de *ATP6V1C1* en el grupo caso según localización:

Tal y como podemos apreciar en la Figura 40, la distribución de la cantidad de *ATP6V1C1* según localización, por orden creciente es, suelo de boca ($4,25 \pm 0,83$, rango 2,88-5,23), trigono retromolar ($5,59 \pm 5,70$, rango 1,35-13,65), base de lengua ($6,70 \pm 3,25$, rango 3,21-11,15), lengua ($7,98 \pm 6,40$, rango 0,63-16,33), encía ($20,61 \pm 18,09$, 0,46-56,01) y mejilla ($24,99 \pm 13,27$, rango 11,00-41,52). Sin embargo, un análisis más detallado, nos indica que esto se debe probablemente a que los tumores localizados en la encía, se encuentran todos en estadíos III y IV; así como los de mejilla, los cuales, un 50 % se encuentran en estadio IV. Las diferencias no son estadísticamente significativas (Kruskal Wallis=9,98, $p=0,07$).

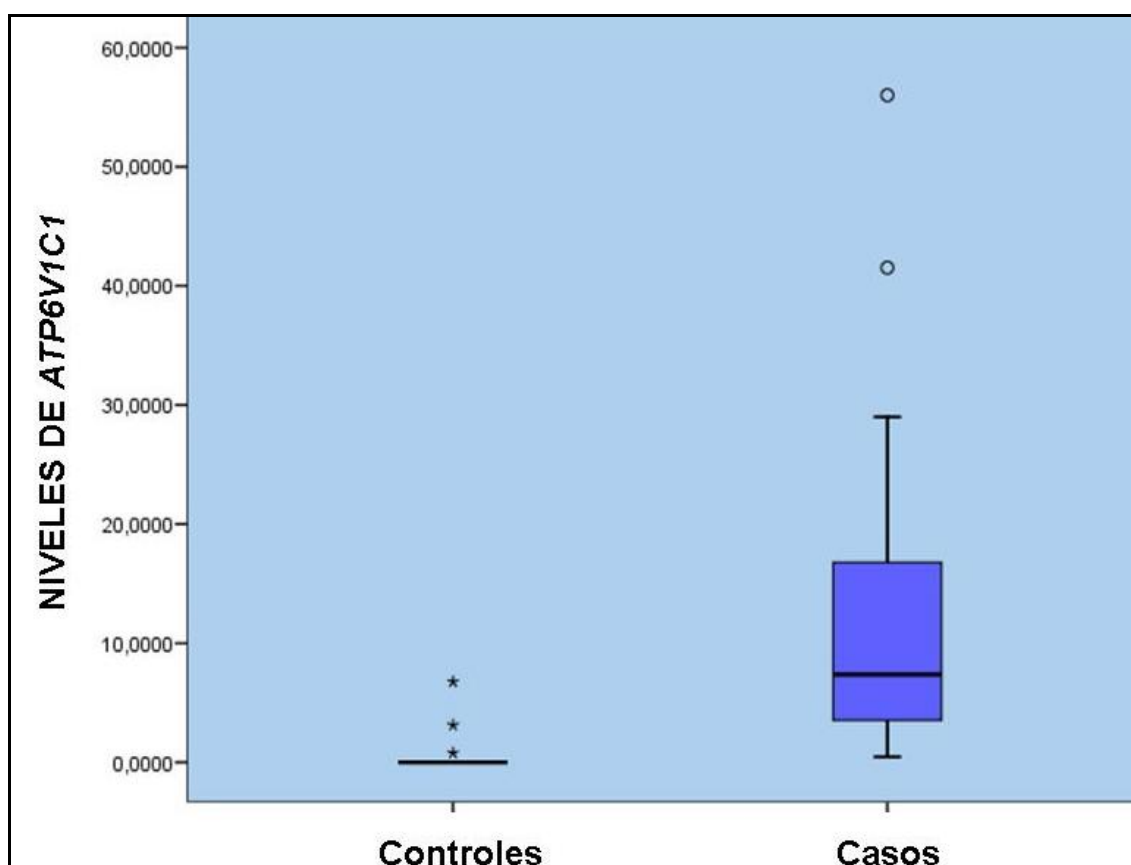


Figura 39. Niveles de expresión de *ATP6V1C1* en casos y controles (U de Mann Whitney=26, $p<0,001$).

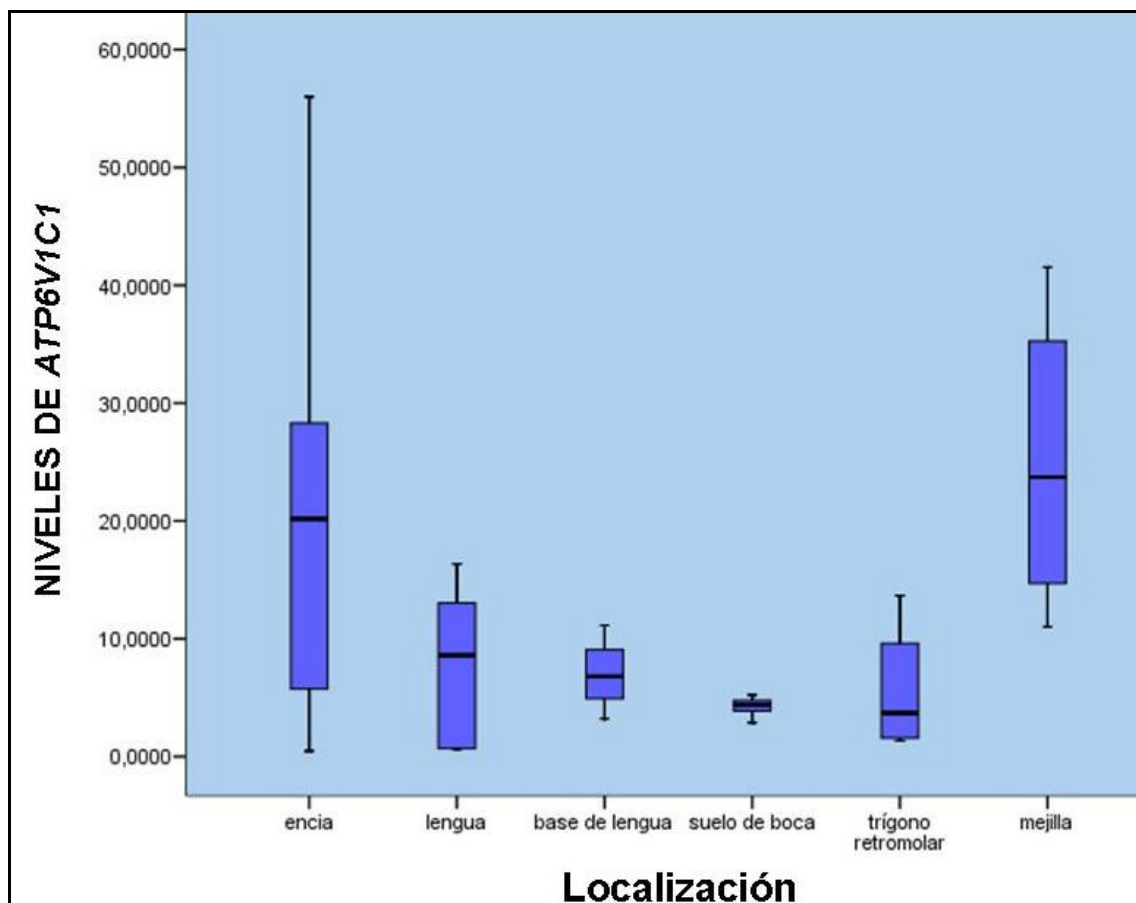


Figura 40. Niveles de expresión de *ATP6VIC1* según localización (Kruskal Wallis=9,98, $p=0,07$).

IV.3.1.4.- Expresión de *ATP6VIC1* en casos según hábito tabáquico:

Los niveles de *ATP6VIC1* en los no fumadores son de $19,55 \pm 15,09$ con un rango 0,63-56,01, mientras que en los fumadores es de $6,33 \pm 3,30$ con un rango 2,88-13,65. Las diferencias no son estadísticamente significativas (Chi-cuadrado=0,463, $p=0,496$).

Analizando estos niveles menores en los fumadores, identificamos que es debido a la diferente distribución del hábito tabáquico según estadio TNM. Mientras que un 66,6 % de los no fumadores se encuentran en estadios III y IV, sólo el 40 % de los fumadores se sitúan en estos estadios.

IV.3.2. Asociación de niveles de expresión de *ATP6VIC1* con estadio TNM

Los niveles de expresión de *ATP6VIC1* según los diferentes estadios tumorales, presentan un gradiente con niveles crecientes a medida que se incrementa el estadio. Así, la expresión de *ATP6VIC1* para los tumores en estadio I, es $3,85 \pm 3,36$ con rango de 0,63-9,43; en estadio II, $12,55 \pm 11,42$ con rango de 3,21-29,00; en estadio III, $10,69 \pm 9,58$ con rango de 0,46-27,71; y en estadio IV, $20,08 \pm 17,15$ con rango de 4,13-56,01. Se representan en la Figura 41.

Las diferencias son estadísticamente significativas (Jonckheere-Terpstra=263,000, $p=0,009$).

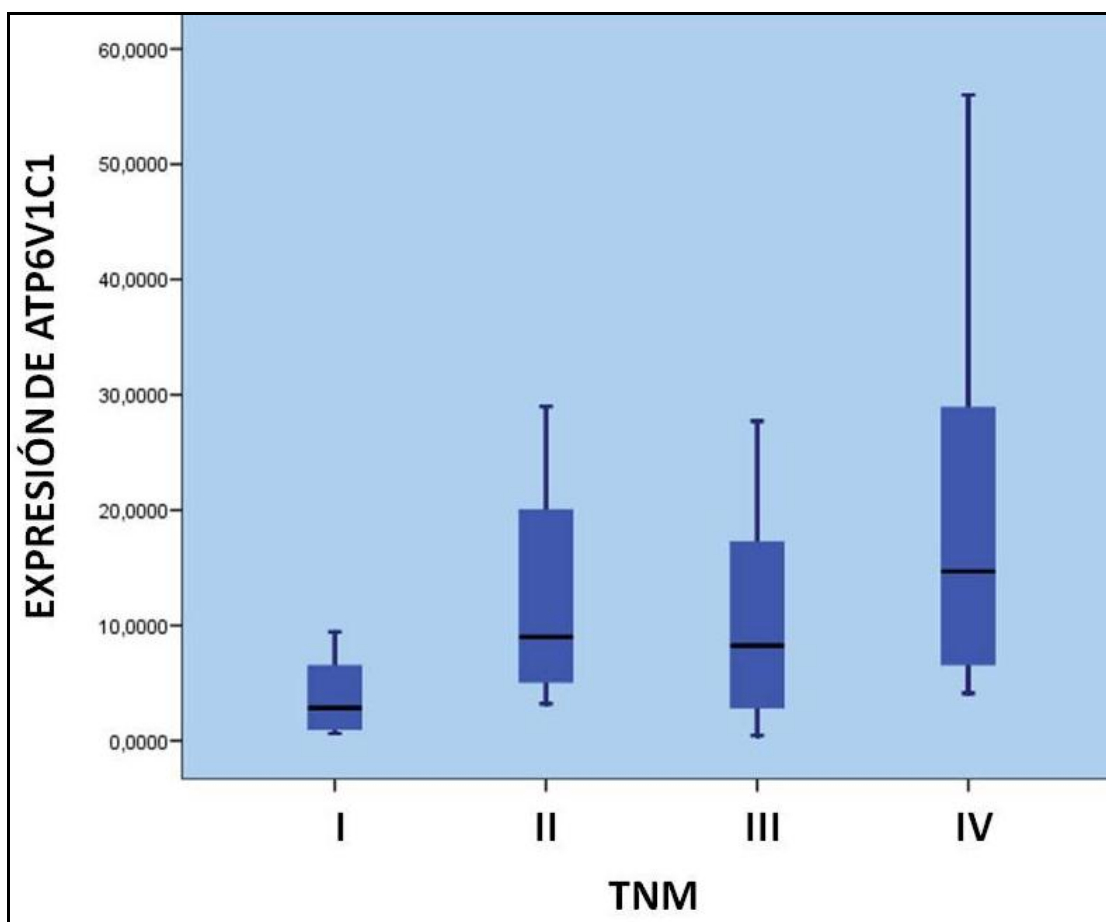


Figura 41. Expresión de *ATP6VIC1* según estadio tumoral (Jonckheere-Terpstra=263,000, $p=0,009$).

IV.3.3. Estudio de rentabilidad diagnóstica

Tal y como hemos descrito en el material y método, la curva ROC nos permite determinar la capacidad que tiene la determinación de los niveles de *ATP6VIC1*, para discriminar entre sujetos sanos y pacientes con COCE. El área bajo la curva (AUC) es de 0,9746, lo que indica la elevada capacidad diagnóstica de la prueba, en este caso entre casos diagnosticados y controles sanos (Figura 42).

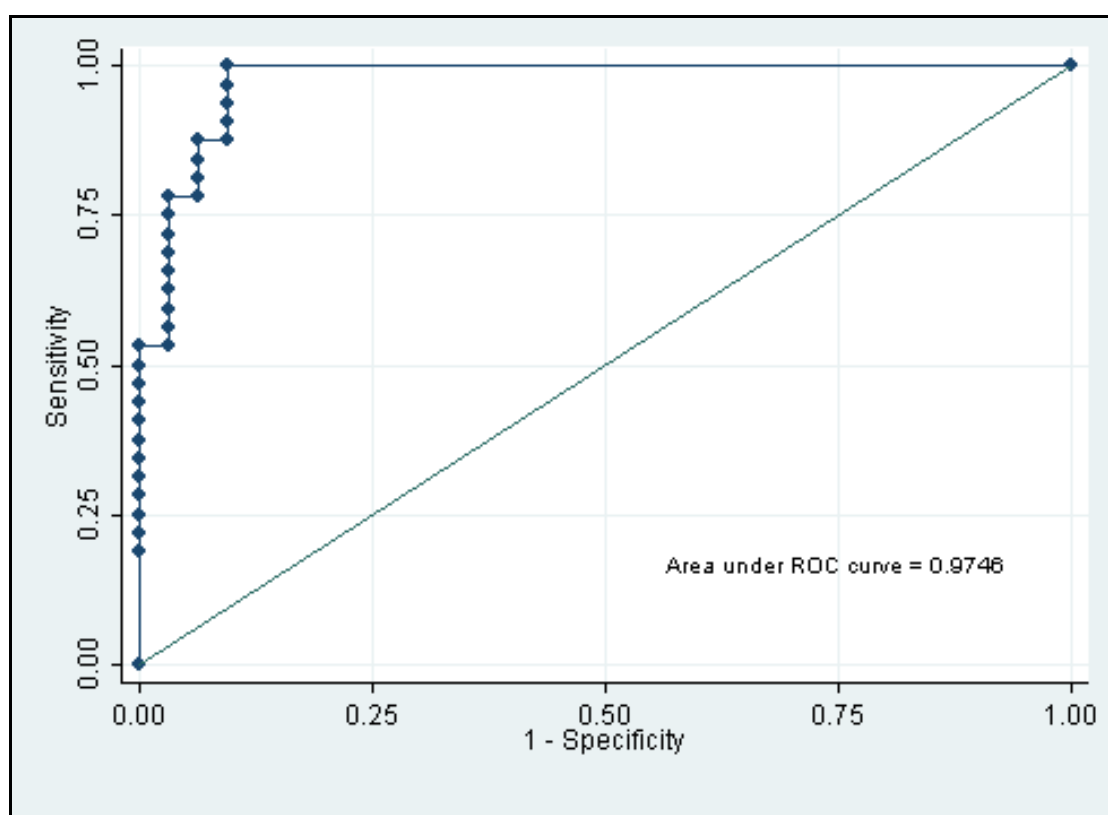


Figura 42. Curva ROC para los diferentes niveles de *ATP6VIC1* en el diagnóstico de COCE

En la Figura 43, podemos ver representados los puntos de corte para la expresión de *ATP6VIC1* en relación a los valores para la sensibilidad y la especificidad de la técnica, en esos puntos.

Tal y como vemos en la Tabla 5, para un punto de corte de 0,218, la sensibilidad y la especificidad tienen valores del 90,63 %. Sin embargo, para este punto de corte, la cantidad de falsos positivos es bastante elevada, en una prueba cuyo empleo en clínica sería realizarla en sujetos con lesiones con sospecha de potencial malignidad. Se estimaron las razones de verosimilitud para cada punto de corte, estudiando la capacidad discriminativa. Con estas consideraciones se analizó como punto de corte el valor de expresión de *ATP6VIC1* de 0.5, que presenta una sensibilidad del 81.5% y una especificidad del 93.7%, con unas razones verosimilitud de 13 (RV+) y 0.06 (RV-) respectivamente.

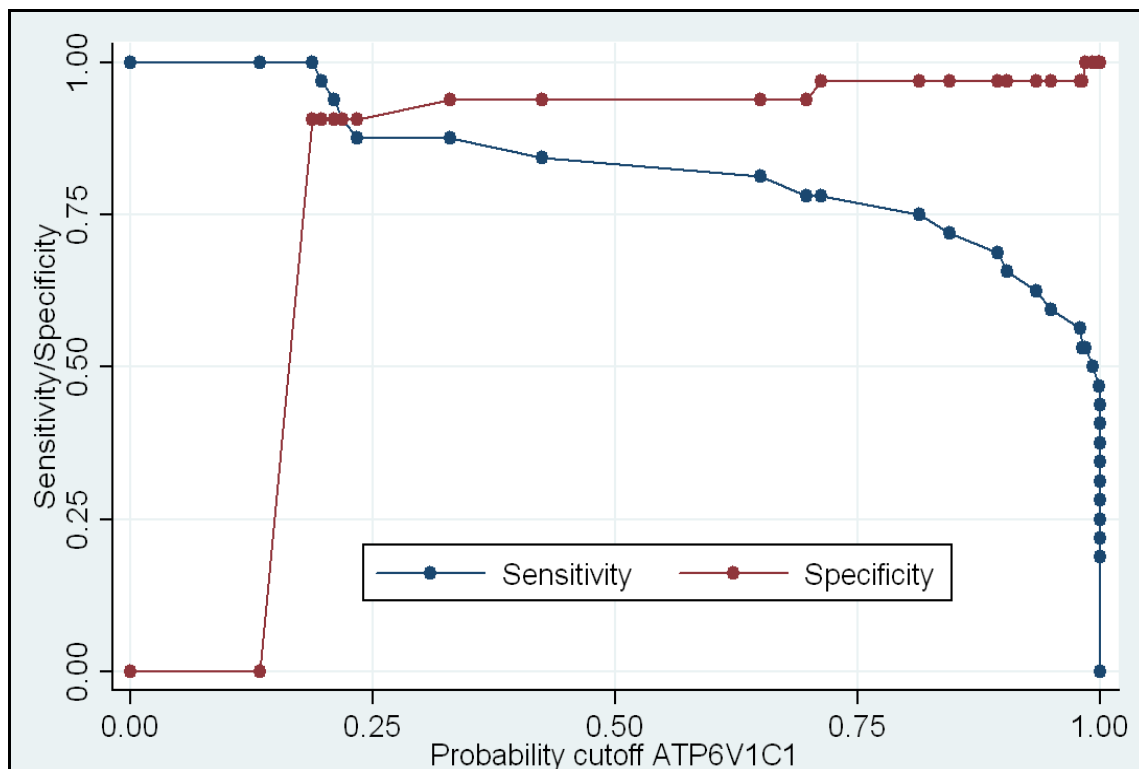


Figura 43. Representación gráfica de los valores de la sensibilidad (línea azul) y la especificidad (línea roja) para los puntos de corte de expresión de *ATP6VIC1*.

Por su parte, mediante análisis con regresión logística, se analizó el rendimiento diagnóstico de la determinación de *ATP6VIC1* en caso de COCE respecto a controles sanos, valorando la mejora en la misma que se produce con la inclusión de otras

variables en el modelo. Para ello, se ha analizado la inclusión de las variables, sexo y hábito tabáquico, respecto al modelo basal (sólo expresión de *ATP6VIC1*).

EXPRESION <i>ATP6VIC1</i>	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	RV+	RV-
0,813002	0,750000	0,968750	23.44	0,26
0,696819	0,781250	0,937500	12.45	0,23
0,711953	0,781250	0,968750	24.41	0,23
0,500000	0,812500	0,937500	30	0.06
0,329883	0,875000	0,937500	14	0,13
0,233310	0,875000	0,906250	9,33	0,14
0,218178	0,906250	0,906250	9.66	0.16

Tabla 5. Valores para la sensibilidad, la especificidad y las razones de verosimilitud positiva (RV+) y negativa (RV-) en los distintos puntos de corte de *ATP6VIC1*.

Si establecemos un modelo de regresión, teniendo en cuenta sólo la expresión de *ATP6VIC1*, los valores de los índices diagnósticos para un punto de corte de 0.5, son los que podemos observar en la Tabla 6.

ÍNDICES DIAGNÓSTICOS	VALOR %
Sensibilidad	81,25
Especificidad	93,75
Valor Predictivo Positivo (VPP)	92,86
Valor Predictivo Negativo (VPN)	83,33
Exactitud o Accuracy	87,50

Tabla 6. Valor de los índices diagnósticos, teniendo en cuenta únicamente la expresión de *ATP6VIC1* y marcando 0.5 el nivel de expresión a partir del cual se considera una muestra como COCE.

Si establecemos un modelo de regresión teniendo en cuenta además de la expresión de *ATP6VIC1* el tabaco, el valor de los índices diagnósticos podemos observarlo en la Tabla 7. Como vemos, tanto la validez como la seguridad diagnóstica de la prueba se incrementan, así como su rentabilidad global, accuracy de 95.31 frente a 87.50 en el modelo basal.

ÍNDICES DIAGNÓSTICOS	VALOR %
Sensibilidad	93,75
Especificidad	96,88
Valor Predictivo Positivo (VPP)	96,77
Valor Predictivo Negativo (VPN)	93,44
Exactitud o Accuracy	95,31

Tabla 7. Valor de los índices diagnósticos, teniendo en cuenta la expresión de *ATP6VIC1* y el consumo de tabaco, marcando 0.5 el nivel de expresión a partir del cual se considera una muestra como COCE.

Para el modelo con *ATP6VIC1* y tabaco, las razones de verosimilitud son: $RV_{+} = 30$ y $RV_{-} = 0,06$. Es decir, diagnosticar a un paciente como COCE positivo, siendo el test positivo, es 30 veces más probable que hacerlo como COCE negativo siendo el test también positivo. De la misma manera, diagnosticar a un paciente como COCE positivo, siendo el test negativo, es solamente 0,06 veces más probable que hacerlo como COCE negativo, siendo el test también negativo.

V.- DISCUSIÓN

El COCE es la neoplasia maligna más frecuente de la cavidad oral. Representa entre un 90 y un 95 % de todas las lesiones malignas de la boca, por lo que es considerado casi como sinónimo de cáncer oral. Aunque el diagnóstico es anatomopatológico, cada día cobra más importancia la utilización del análisis molecular para determinar precozmente cambios malignos en la mucosa oral o para evidenciar aspectos específicos del tumor, como la capacidad invasiva o el comportamiento metastásico.

Existe una limitación para predecir la evolución de los pacientes con COCE. Éste es uno de los obstáculos que nos encontramos para el tratamiento efectivo de los mismos. Aunque el pronóstico se correlaciona con diversos factores como la localización anatómica, el tamaño del tumor, su grado de diferenciación y la presencia de ganglios linfáticos invadidos, permanece una variabilidad en el curso clínico de los pacientes aún sin explicación. Por ejemplo, somos incapaces de clasificar tumores por su potencial de producir metástasis o por su resistencia al tratamiento mediante quimioterapia.

Aunque el sistema TNM incluye factores pronósticos importantes, no puede predecir con exactitud las propiedades biológicas de los tumores, por lo que no nos permite adecuar el tratamiento al comportamiento biológico del mismo. Así, este sistema no explica la proporción considerable de tumores pequeños con un pronóstico más desfavorable de lo esperado, debido a la falta de conocimiento de los procesos biológicos implicados (61). Por todo ello, cabría pensar que el objetivo final debería ser predecir el pronóstico del tumor y a ser posible, diagnosticarlo precozmente en los estadios iniciales, pero no debemos olvidar que inicialmente tendríamos que conocer de una forma clara los mecanismos patogénicos que participan en la carcinogénesis (6,358-360).

Por otra parte, los márgenes quirúrgicos tras la extirpación de estos tumores, sólo se examinan para estudiar la presencia de datos de malignidad a nivel microscópico, sin una evidencia científica de que no existan ya cambios moleculares en los márgenes del tejido extirpado que predispongan a la aparición de recidivas. Esto parece ser insuficiente, por lo que se necesita buscar nuevos métodos, como por ejemplo un sistema de estadiaje molecular basado en alteraciones genéticas para detectar células neoplásicas, como la detección de mutaciones en el gen *p53* mediante PCR (361). Esta tesis doctoral pretende poder establecer una relación causal o de progresión entre los

niveles de expresión de *ATP6V1C1* y el COCE y permitir utilizar su determinación como método diagnóstico.

El diagnóstico histopatológico proporciona sólo una información parcial e indirecta de los cambios neoplásicos. Es por ello, que consideramos necesario el estudio del COCE a un nivel genético, para poder caracterizar los cambios responsables de la carcinogénesis. Si queremos un diagnóstico precoz del COCE, la posibilidad de predecir cómo va a evolucionar y el desarrollo de terapias génicas específicas, parece claro que el primer paso para conseguirlo es descifrar y comprender su comportamiento desde un punto de vista genético.

En esta Tesis, a partir de un análisis previo con *microarrays*, dónde se han identificado diversos genes alterados en el COCE, hemos validado la sobreexpresión en dicho tumor mediante RT-qPCR de *ATP6V1C1*. El objetivo es estudiar cómo puede influir su comportamiento en el crecimiento y desarrollo del tumor, determinándolo en muestras de citología exfoliativa como técnica no invasiva.

La selección del **método de validación** se lleva a cabo apoyándonos en la revisión bibliográfica de lo que se había publicado hasta la fecha, y también en el asesoramiento técnico por parte de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica del Servicio Galego de Saúde (SERGAS). De acuerdo con la mayoría de los autores, tanto en otros tipos de cáncer (362) como en el COCE y en tumores de glándulas salivales (192,363), la PCRq-RT es el método más frecuentemente utilizado. Estudios piloto demuestran que el aislamiento de RNA a partir de citología exfoliativa es posible y que el RNAm puede ser detectado usando qRT-PCR o análisis mediante *microarrays* (194,364,365). De la misma forma, también se utiliza esta técnica para la validación de los resultados con el *microarray* en el caso de muestras de citología exfoliativa (285), por lo que la consideramos como la más idónea.

En relación al **tipo de tejido analizado**, hemos utilizado muestras de citología exfoliativa para el análisis molecular, para verificar la posibilidad de utilizar esta técnica de manera rutinaria en el análisis de expresión genética, ya que sabemos que para el diagnóstico histopatológico no es una técnica adecuada. Además diversos autores consideran que los cambios más precoces en el proceso de la carcinogénesis, se

producen en las células epiteliales de las capas más superficiales, por lo que la citología exfoliativa podría ser la técnica de elección (264,359,366,367).

Mientras que la evaluación citológica oral clásica requiere una labor intensa y un elevado grado de experiencia para la identificación y valoración de células con morfología sospechosa, el análisis de las alteraciones moleculares es objetivo y trata de identificar anomalías génicas específicas (277). En cuanto a los estudios específicos de citología exfoliativa, los estudios moleculares incluyen el análisis de la inestabilidad genómica como la pérdida de heterocigosidad (LOH), la inestabilidad de microsatélites (MSI) (282,283), el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) (285) y patrones de metilación (282) e hipermetilación (286). Más recientemente, Driemel et al., estudian la expresión de moléculas de la matriz extracelular en muestras citológicas, observando la expresión de ARNm de laminina-5 y tenascina-c en COCE (293).

Recientemente se ha demostrado la posibilidad de extraer ARN desde células obtenidas por raspado, indicando su interés y utilidad en el diagnóstico precoz de lesiones premalignas y cancerosas orales (368). Establecer la validez de estas mediciones para la cuantificación de la expresión genética es el principal objetivo (366).

Existen estudios que analizan la expresión de RNA en saliva, sin embargo aunque presenta la ventaja de la facilidad de toma de la muestra, no proporciona una medición directa de la expresión genética del tejido (369,370). El análisis en saliva mide RNA estable extracelularmente, identificando marcadores derivados de la enfermedad propiamente dicha, pero no acerca de la etiología de la misma (184). El análisis del RNA obtenido mediante citología exfoliativa, presenta la ventaja de poder aislar células vivas de sitios con riesgo de enfermedad. Cambios tempranos en la progresión de la enfermedad que afectan a la expresión genética, pueden ser detectados con una técnica mínimamente invasiva. Existen dos problemas potenciales, la contribución a la totalidad de la muestra de RNA de células muertas o en proceso de muerte y también las diferencias en la toma de las muestras por parte del investigador que contribuyen a acentuar las diferencias en el tipo y número de células aisladas (366).

El aislamiento de DNA de células epiteliales ha sido demostrado en varios estudios, sin embargo el aislamiento de RNA no ha sido validado tan fehacientemente debido a las ribonucleasas presentes en la saliva que rápidamente degradan el RNA celular durante

la recolección. Los nuevos medios de transporte han permitido mejorar este problema. Spira et al., son los primeros en demostrar la utilización de RNA obtenido de la mucosa oral mediante diversos instrumentos para su análisis mediante PCR y espectrometría de masas (371).

Spivack et al., concluyen en la utilización del RNA obtenido de citología exfoliativa para la determinación de la susceptibilidad al cáncer de poblaciones sanas, la detección de marcadores en estadios tempranos de carcinogénesis y para la evaluación de la eficacia o toxicidad de los agentes quimiopreventivos o quimioterapéuticos, mediante el análisis de la expresión genética de las muestras citológicas (364). Todos estos resultados, avalan la utilización de la citología exfoliativa para el análisis molecular de la expresión genética del COCE.

En cuanto al **tamaño de la muestra**, el número de pacientes seleccionados es de 16, considerando esta tesis como un estudio preliminar de un proyecto de investigación más amplio. La duración para una potencia estadística superior al 80 %, es de aproximadamente 3 años, en función de la cantidad de tumores recogidos en el Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial.

Utilizamos la RT-qPCR como método de validación y lo hacemos en una **serie de pacientes** distinta a la empleada en el estudio con *microarrays* (10). El hecho de que sea una serie de pacientes distinta permite una validación más rigurosa si cabe, puesto que los hallazgos encontrados se cumplen en distintos grupos de pacientes con COCE (182). Si revisamos la bibliografía, vemos que la mayoría de los autores realizan la validación con la misma serie de pacientes. En cuanto al **número de genes seleccionados**, es similar entre los diversos estudios. Así, Hwang y cols. (182) seleccionan 3 genes para su validación con RT-qPCR. Ibrahim y cols. (181) eligen 4 genes para su validación con RT-qPCR e inmunohistoquímica, en un estudio acerca del perfil de expresión génica del COCE en distintas poblaciones. Nosotros como habíamos demostrado previamente la sobreexpresión mediante PCRq-RT, hemos seleccionado un solo gen y analizar su implicación de manera más detallada en una técnica diagnóstica alternativa como la citología exfoliativa.

En lo que respecta a los **controles del estudio**, como nos hemos referido en la metodología, tomamos las muestras de los casos en los pacientes con tumor y los controles en pacientes sanos, para obviar las posibles alteraciones en la expresión de *ATP6V1C1* en la mucosa sana del paciente con cáncer, considerando al cáncer como una patología sistémica y no loco-regional, coincidiendo con otros autores (372). Sin embargo, otros estudios basan su comparación en tejidos normales obtenidos de distintos órganos como las amígdalas, el colon, el hígado, el estómago, el riñón y el cerebro de distintos pacientes (372), con el inconveniente de que estos órganos tienen un perfil de ARNm diferente entre ellos.

DATOS CLÍNICOS Y DEMOGRÁFICOS

El grupo de pacientes con COCE analizado, muestra una media de **edad** similar a las descritas en otros estudios (43,46,47). Más del 90% de los pacientes con cáncer oral son mayores de 45 años, siendo la edad media de presentación alrededor de los 60 años (43). Entre el 1 y el 3% de todos los COCE, aparecen en pacientes menores de 40 años (44,45). La presentación del COCE en pacientes jóvenes es rara, aunque esta incidencia parece estar aumentando (373). Para algunos autores, los pacientes jóvenes presentan tumores más agresivos con tasas de recidivas, metástasis cervicales y mortalidad más elevadas (374). Sin embargo, otros estudios no corroboran estos hallazgos (375). Considerando como jóvenes a los pacientes con COCE por debajo de los 40 años, todos nuestros pacientes presentan una edad superior.

En cuanto al **sexo** de los casos, evidentemente no existe ningún tipo de selección en base a este criterio. La proporción entre hombres y mujeres en los casos, es superior en los hombres, coincidiendo con la mayoría de los estudios (46,55,88,376). En cuanto a los controles, la selección es al azar, ya que son individuos voluntarios. La existencia de un mayor número de mujeres, está reflejando simplemente la distribución de los estudiantes universitarios, dónde el sexo femenino es el predominante.

Se ha descrito que el **consumo de tabaco y alcohol**, además de ser un factor de riesgo reconocido, se asocia también a un pronóstico desfavorable en pacientes con COCE

(61,235). Sin embargo, otros autores no encontraron asociación entre el consumo de tabaco y alcohol y el pronóstico en pacientes con COCE (55).

En relación al consumo de tabaco, aunque el grupo caso está formado mayoritariamente por no fumadores, la comparación con los controles no resulta estadísticamente significativa. Esto es probablemente debido al tamaño muestral y la relación con la variable edad, es decir, los controles son individuos jóvenes dónde el intervalo de consumo del carcinógeno es relativamente corto.

La ausencia de datos en relación con el consumo de alcohol en la serie de pacientes estudiada por nosotros, no nos permite relacionar la presencia de este hábito y los demás parámetros estudiados.

La **localización** más frecuente del tumor en nuestra serie de pacientes es la lengua. Esta localización ya ha sido descrita como la más frecuente por otros autores (32,47,55,201,205,377).

En cuanto al **estadío tumoral**, la mayor parte de los pacientes con COCE se diagnostican en estadios avanzados (III y IV). Esto concuerda con casi todos los estudios, hecho que justifica la necesidad de diagnosticar precozmente, un tumor que se localiza en una cavidad abierta fácilmente accesible y su diagnóstico debería ser temprano (6,57,233,358,360,378).

Además de la asociación estadísticamente significativa en la cantidad de varones en el grupo caso, no hemos encontrado ninguna otra asociación con ninguna de las variables clínicas estudiadas. En cualquier caso, no se pueden hacer inferencias estadísticas en lo que respecta a los datos epidemiológicos y sociodemográficos, dado el reducido tamaño muestral.

ANÁLISIS MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA

En cuanto al análisis inmunohistoquímico, la identificación de la expresión de marcadores tumorales en células exfoliadas de la cavidad oral ha recibido un especial interés. Entre ellos la expresión de citoqueratinas (267), *FHIT* (triada histidina frágil)

(272), mutaciones del gen supresor de tumor *p53* (273,274), metalotianinas (275) y el antígeno de histocompatibilidad del grupo H tipo 2 (*ABH* tipo 2) (271). Sin embargo, ningún estudio ha determinado la expresión de V-ATPasas en muestras de COCE, hecho que dificulta la discusión de nuestros resultados. Hemos decidido realizar el análisis de la expresión inmunohistoquímica de ATPase C1 en biopsias, para discriminar la posible expresión de la proteína por debajo de los estratos epiteliales, zona de la que no es posible o muy complicado, obtener células mediante citología exfoliativa (264,366).

Otros estudios han demostrado mediante inmunohistoquímica que la V-ATPasa se localiza en la membrana plasmática de las células cancerígenas del cáncer de mama (300,311) y en las de cáncer de pulmón (21). Además lo hace de forma predominante en las células altamente metastáticas y con menor intensidad en las células de bajo poder metastásico (300,311,315). Según Martínez-Zaguilán et al., la expresión de V-ATPasas en la membrana plasmática se debe a algún tipo de desajuste de los constituyentes normales de la célula como el citoesqueleto (29,311).

Curiosamente, las células con poco poder metastásico, usan preferentemente los mecanismos de transporte basados en Na^+/H^+ y HCO_3^- , mientras que células con alto poder metastásico usan V-ATPasas. Además, estas células son más invasivas y migratorias que las de bajo poder metastásico. Estos datos indican que las pmV-ATPasas están implicadas en la adquisición de un fenotipo más metastásico (379).

Los hallazgos de nuestro estudio nos hacen suponer que la localización inmunohistoquímica de la subunidad C1 está asociada a la presencia de V-ATPasas, ya que esta subunidad se encarga del ensamblaje de las mismas. En las células epiteliales normales, la presencia de V-ATPasa parece estar asociada a la actividad metabólica celular. Así, se encuentra expresión inmunohistoquímica en el estrato basal e intermedio, donde la actividad metabólica celular es mayor, y hay una ausencia absoluta de expresión en la capa superficial queratinizada, donde va disminuyendo progresivamente el metabolismo celular. La alta actividad metabólica de las células de los estratos basales del epitelio de la cavidad oral, posiblemente esté asociada a una producción elevada de protones que la célula precise eliminar para evitar que la disminución que producen en el pH las destruyan. Las V-ATPasas constituyen un mecanismo activo de bombeo de protones entre los espacios intracelulares, como puede

ser a través de la membrana nuclear, y a través de la membrana plasmática hacia el espacio extracelular, que seguidamente serían transportados desde la submucosa por el torrente circulatorio, para ser eliminados en forma de CO₂ por el aparato respiratorio.

Las zonas positivas subepiteliales parecen corresponder a células endoteliales de los vasos sanguíneos y a otras células aún por clarificar. Esto habla de la ubicuidad de la subunidad C1, probablemente asociada al ensamblaje del complejo V-ATPasa. Aunque no debemos olvidar que la subunidad C1 puede estar asociada a otras estructuras distintas a la V-ATPasa (301).

En el caso del COCE, el alto metabolismo que presentan las células neoplásicas exige la presencia de medios activos de expulsión de protones del interior celular para poder permitir el normal desarrollo de las funciones celulares. Por otra parte, el crecimiento desordenado del tumor sin una vascularización adecuada hace que el medio intercelular no drene adecuadamente los protones producidos como consecuencia del metabolismo celular, conduciendo a una acidificación de dicho medio intercelular, lo cual exige la presencia de medios activos en la membrana celular para la expulsión de protones en contra del gradiente, como la V-ATPasa. La acidificación del medio extracelular como consecuencia de la mala vascularización y del metabolismo celular favorece la actividad de las enzimas proteolíticas que permiten la destrucción de la arquitectura proteica intercelular, como el colágeno, y el avance invasivo y metastásico del tumor (303,311).

Estos hallazgos inmunohistoquímicos confirman dos de nuestras hipótesis establecidas en trabajos previos. En primer lugar, que la expresión de la subunidad C1 procede fundamentalmente de las células epiteliales en biopsias de la mucosa oral normal y de las células neoplásicas en el COCE. En segundo lugar, la intensa tinción encontrada en el COCE, en comparación con el epitelio oral normal, también explica la sobreexpresión de la subunidad C1 encontrada en el COCE con respecto al epitelio oral normal (11). Estos hallazgos podrían ser útiles en el desarrollo de técnicas diagnósticas tanto del COCE, como para el control de lesiones premalignas.

Aunque la expresión es principalmente citoplásmica, en algunos casos se ha encontrado tinción perinuclear y nuclear. Existen casos de genes supresores tumorales que inmunohistoquímicamente se localizan en zonas no esperadas teóricamente y que

en estudios más profundos se ha observado que el cambio de localización nuclear o citoplasmática se ha relacionado con la agresividad del tumor (380).

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE *ATP6V1C1* MEDIANTE PCR-qRT

En cuanto a los niveles de expresión del gen, confirmamos la sobreexpresión de *ATP6V1C1* en muestras de citología exfoliativa de COCE, comparándolo con la mucosa oral de individuos sanos, de una manera estadísticamente significativa. La discusión de nuestros resultados con otros estudios resulta compleja, puesto que no existe ningún estudio que determine los niveles de expresión de este gen en el COCE y mucho menos en muestras de citología exfoliativa. Sólo algunos estudios acerca del COCE utilizan *microarrays* que contienen secuencias de ADNc para *ATP6V1C1* (180,182,363), pero ninguno de ellos llega a validar los resultados.

La expresión de *ATP6V1C1* es estadísticamente superior en el grupo caso, hecho que confirma la hipótesis principal de esta tesis. Además, la expresión del gen es estadísticamente superior en los tumores en estadio más avanzado (III y IV) que en los tumores en estadios iniciales (I y II). Además, las diferencias de expresión presentan una proporción con gradiente. Este hecho, es compatible con la idea de que los tumores con mayor grado de invasión, presentan unos niveles de pH más bajos, lo que obliga a las células a expresar una mayor cantidad de V-ATPasas para poder sobrevivir al medioambiente ácido (300,315). Sin embargo, nuestros resultados no parecen concordar con otros estudios como el de Méndez y cols. (180), que demuestran que la gran mayoría de las alteraciones genéticas observadas en el COCE, aparecen ya en estadios iniciales del tumor, no observándose grandes cambios durante la evolución posterior del mismo. Sin embargo, el hecho de que el grupo de genes implicados en la patogénesis del COCE sea elevado, nos hace pensar en que algunos de estos genes (los que varían con la evolución del tumor), podrían ser utilizados como marcadores tumorales en el diagnóstico y estudio de la progresión de estos tumores, así como para su uso como dianas terapéuticas durante el desarrollo de terapias génicas.

No hemos encontrado ninguna asociación estadísticamente significativa con ninguna de las variables estudiadas, además del estadio TNM. Las diferencias existentes entre

varones y mujeres son debidas al estadio tumoral en el que se encuentran un gran porcentaje de las mujeres (III y IV). Las diferencias encontradas en cuanto a la localización, se deben probablemente a que aquellos tumores que presentan una mayor expresión de *ATP6V1C1* (encía y mejilla), se encuentran mayoritariamente en estadios III y IV. Aunque los niveles de *ATP6V1C1* son menores en los fumadores, esto es debido también a que un porcentaje mayor de los no fumadores se encuentran en estadios III y IV. Además, en un estudio previo sobre biopsias de COCE, Otero et al., encuentran que existe una relación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión del gen y el tabaco (116). Estos datos, justifican la asociación estadísticamente significativa existente entre los niveles de *ATP6V1C1* y el estadio TNM.

En cuanto a las pruebas de rentabilidad diagnóstica, los valores de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razones de verosimilitud, confirman la eficacia de la medición de los niveles de *ATP6V1C1* entre casos y controles. La mejora en los índices diagnósticos para el modelo de regresión logística que incluye además de la expresión de *ATP6V1C1*, el tabaco, indica la influencia del carcinógeno en el COCE y probablemente en los niveles del transcrito. En cualquier caso, entendemos que este estudio es un paso preliminar necesario para poder establecer el diagnóstico diferencial del COCE no sólo con muestras de mucosa oral sana, sino también con lesiones precancerosas como la leucoplasia, la eritroplasia o el liquen erosivo.

Por todo ello, para discutir nuestros resultados, tenemos que hacer una revisión de la bibliografía acerca de la importancia de las V-ATPasas y específicamente de la subunidad C1 en los tumores sólidos, en lo que respecta al control del pH, el fenómeno de resistencia a multidrogas (MDR) y las posibles aplicaciones terapéuticas de su bloqueo mediante inhibidores específicos.

A. PAPEL DE LAS V-ATPasas EN EL CONTROL DEL pH Y LA METÁSTASIS

En las células eucarióticas, el pH citosólico parece ser estrictamente regulado por cuatro mecanismos: familia de intercambiadores protones-sodio (NHE), familia de transportadores de bicarbonato (BCT), familia de transportadores de monocarboxilato (MCT) y las bombas de protones (ATPasas) (335,381).

Sabemos que las células tumorales tienen un valor de pH intracelular (pHi) alcalino (7,12-7,65 comparado con 6,99-7,20 en tejidos normales) y un valor de pH extracelular (pHe) intersticial ácido (6,2-6,9 comparado con 7,3-7,4). Por tanto, el microambiente extracelular del tumor es más ácido que el intracelular, creando un gradiente de pH invertido a través de la membrana celular que ya es evidente durante el primer paso de la formación neoplásica y que aumenta con la progresión del tumor (382). Sin embargo Prescott et al., afirman que la magnitud de esta acidosis extracelular varía en función de los tipos individuales de tumores (383), incluso existen regiones más ácidas a lo largo de la extensión de un tumor (384).

Becelli et al., confirman estos resultados en pacientes con cáncer oral en los que el pHe aparece ligeramente ácido, en torno a 6.8-7.0, como previamente se había descrito en tumores sólidos en modelos animales. Según este estudio, el gradiente inverso está directamente relacionado con la resistencia a agentes quimioterápicos (385).

Para sobrevivir en este microambiente, las células tumorales deben exhibir un sistema regulador del pH citosólico. Esto puede explicar el hecho de que las V-ATPasas, que normalmente residen en organelas ácidas, se localicen además en la superficie celular regulando el pH y exacerbando la habilidad migratoria de las células metastáticas (300,315).

La presencia de V-ATPasa en la membrana plasmática de diversas células tumorales humanas, se ha demostrado de forma indirecta y se ha asociado con la alcalinización del citoplasma de dichas células (300,311). Según Sennoune et al., los cambios en el pH citosólico, presentan múltiples expresiones fenotípicas, pero para ellos la alteración de una simple proteína, la V-ATPasa de la membrana plasmática, es la responsable de las disfunciones en las rutas proteicas y celulares de la diabetes y el cáncer (15) (Figura 44).

Tal y como hemos descrito en nuestro análisis inmunohistoquímico, otros autores han demostrado que la V-ATPasa se localiza en la membrana plasmática de las células cancerígenas del cáncer de mama (300,311) y en las de cáncer de pulmón (21) y que lo hace de forma prominente en las células altamente metastáticas y con menor intensidad en las células de bajo poder metastático (300,311).

Según Martínez-Zaguilán et al., la expresión de V-ATPasas en la membrana plasmática se debe a algún tipo de desajuste de los constituyentes normales de la célula (311). Éstos incluyen el citoesqueleto (29), secuencias líder (348), o un chaperon (317).

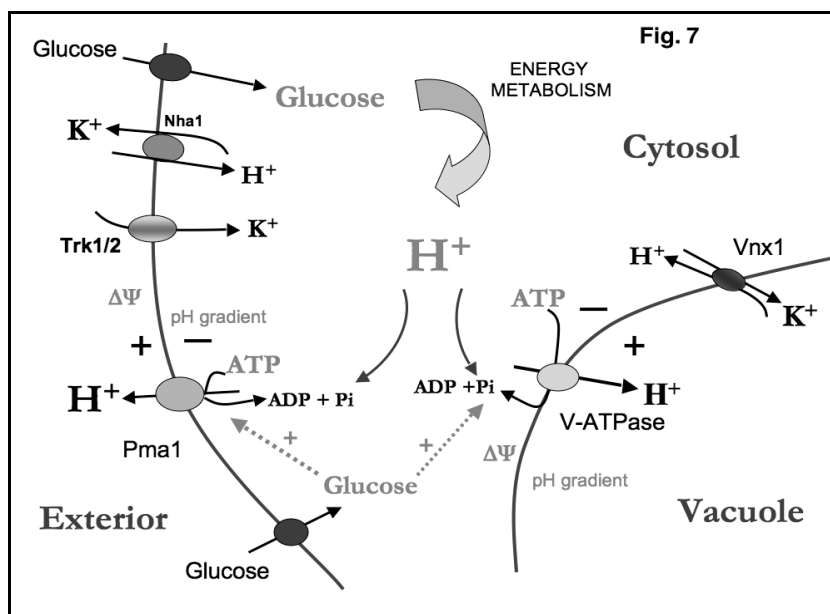


Figura 44. Papel de la V-ATPasa en el control del pH intra y extracelular (386).

El aumento del pH intracelular induce la activación del metabolismo glicolítico aeróbico (387), que aumenta la cantidad de lactato celular que es transportado fuera de la célula por la vía co-transportadora H⁺/lactato (MCT) (388). Esto promueve el aumento del pH intracelular y exacerba el desarrollo inicial del microambiente intersticial ácido y el gradiente de pH transmembrana invertido (12,14). Este incremento del pH intracelular es concomitante con el aumento de la síntesis de ADN (387,389,390), la progresión del ciclo celular (391-393), el crecimiento independiente de suero y sustrato (387) y el crecimiento *in vivo* del tumor (387,394), desencadenando todo ello un aumento patológico y desorganizado de la densidad y el número celular.

Una consecuencia del aumento de la densidad celular en el tumor, es una mayor dificultad de acceso al sistema circulatorio (395), que causa una eliminación ineficaz de productos metabólicos (como el ácido carbónico). Esto, junto con el aumento de la glicólisis aeróbica (384,387), proporciona al tumor un microambiente metabólico caracterizado por bajos niveles de suero, hipoxia y un pH extracelular ácido. Este

microambiente aumenta la capacidad invasiva del tumor y la expresión de factores/receptores de crecimiento y angiogénicos. Además, la adaptación específica de las células tumorales a su microambiente metabólico, hace de éste una fuerza de conducción fundamental en la progresión del tumor hacia un fenotipo metastásico más agresivo (12).

Los mecanismos por los que las células malignas acidifican su microambiente intratumoral y la regulación de estos procesos por otros componentes del microambiente, no están del todo claros. La producción de lactato comúnmente se ha considerado como el primer mecanismo de acidificación del microambiente (382), pero otros mecanismos de regulación del pH celular contribuyen a la acidificación extracelular en las células tumorales, como la activación de NHE1 por la carencia de suero (NHE1 es miembro de una familia que expulsa ácidos y media el cambio de sodio extracelular por protones intracelulares a través de la membrana), la acidez del pH extracelular y la hipoxia (387).

El componente ácido del microambiente metabólico intratumoral, aumenta el potencial metastásico promoviendo la angiogénesis (15,396), el crecimiento independiente de anclaje, la inestabilidad genética y la invasión (382). Ésta ocurre mediante una compleja serie de interacciones con el tejido huésped en el que la infiltración y la penetración del tejido normal por células cancerígenas se lleva a cabo mediante diversos procesos, varios de ellos regulados por el pH extra e intracelular (12).

Rojas et al., encuentran que las células del endotelio microvascular con mayor capacidad migratoria, expresan V-ATPasas en la membrana plasmática, hecho concordante con nuestros resultados. El tratamiento de éstas con inhibidores de las V-ATPasas, reduce el flujo de protones, vía inhibición de pmV-ATPasas y la migración celular, lo que sugiere que éstas son esenciales para la regulación del pH citosólico y la migración de las células del endotelio microvascular (397).

La transformación celular y la carcinogénesis, se acompañan de alteraciones metabólicas con un aumento de la producción de protones, acidificación del medio extracelular y alcalinización del citoplasma (13,311,398). Por tanto, el desarrollo y mantenimiento de este gradiente, es debido directamente a la habilidad de las células tumorales a secretar protones (H^+), acidificar el medio extracelular (12-14) y mantener

alcalino el pH citosólico (15). Además, esta capacidad aumenta con la agresividad del tumor (399,400).

El flujo de protones vía VATPasa evaluado por espectroscopio fluorescente en células vivas, fue mayor en las células más metastásicas que en las menos metastásicas. Curiosamente, las células con poco poder metastásico usaban preferentemente los mecanismos de transporte basados en Na^+/H^+ y HCO_3^- , mientras que células con alto poder metastásico usaban V-ATPasas (Figura 45). Además, estas células eran más invasivas y migratorias que las de bajo poder metastásico. Estos datos indican que las V-ATPasas localizadas en la membrana plasmática están implicadas en la adquisición de un fenotipo más metastásico (379).

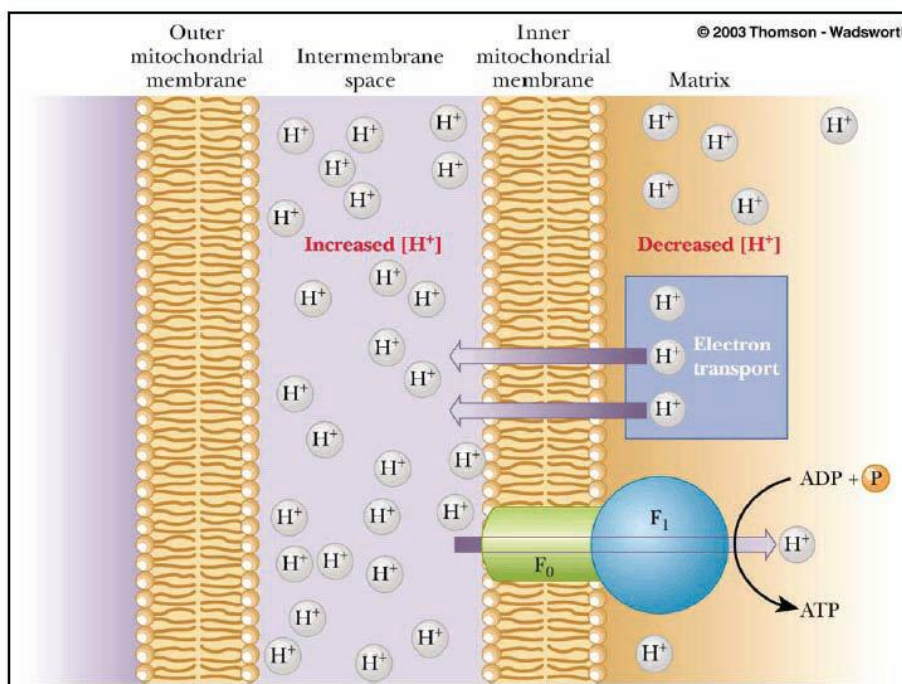


Figura 45. Sistema regulador del pH citosólico que permite la acidificación del medio extracelular mediante la secreción de protones. Imagen cedida por la Dra. Otero Rey.

Las V-ATPasas también presentan un papel importante en el desarrollo de metástasis tumoral como hemos dicho anteriormente. Muchas células tumorales secretan enzimas lisosómicas que participan en la degradación de la matriz extracelular necesaria para la invasión metastásica. Estas enzimas presentan un pH óptimo bajo y son las V-ATPasas las encargadas de acidificar el micromedioambiente (303,311). La adquisición de

movilidad y fenotipo invasivo, es un requisito de la célula para ser metastásicamente competente (12,15). El tratamiento con inhibidores de la V-ATPasa tipo bafilomicina A1 y concanamicina A, inhiben la actividad de la enzima y también la habilidad migratoria de las células altamente metastásicas (13,14,300).

Se ha visto que la disminución del pH extracelular del microambiente tumoral, aumenta la movilidad de las células tumorales mediante la formación de pseudopodias, lo que implica migración celular de células más invasivas. En las células metastásicas induce además un aumento en el número y longitud de pseudopodias (401), proyectándose éstas en la dirección de movimiento de las células tumorales hacia los capilares circulatorios (402) (Figura 46). La protrusión de pseudopodias y el comportamiento migratorio se reducen por el aumento del pH extracelular, que inhibe la actividad de secreción de proteasas y bloquea la actividad de NHE1 (403).

Se ha visto que la mayor invasividad de las células tumorales, es el resultado de dos mecanismos complementarios: la ruptura de las interacciones de la matriz celular que se originan debido al aumento de secreción de ácidos, la actividad de las proteasas (como la catepsina B) y el aumento de la movilidad celular (12,21,300). Las células del cáncer de mama, a través de V-ATPasas, acidifican su medio extracelular facilitando la reabsorción de la matriz extracelular mediante proteasas y metástasis (399).

Como nos hemos referido anteriormente, el microambiente tumoral es esencial en la progresión neoplásica, y una de las características de este microambiente es la disminución del pH extracelular. Dado que V-ATPasa es una bomba de protones reguladora del pH celular, su implicación en la progresión neoplásica no debería sorprendernos. Así, diversas observaciones sugieren que las V-ATPasas podrían estar implicadas en la transformación celular la carcinogénesis y la metástasis tumoral.

El pH celular es crucial para diversas funciones biológicas como la proliferación celular, invasión y metástasis, resistencia a medicamentos y apoptosis. Las condiciones hipóxicas son un fenómeno frecuente durante el desarrollo de tumores sólidos y desencadenan una acidosis intra y extracelular. Esta acidosis celular parece ser un desencadenante de la apoptosis y permite la activación de endonucleasas que inducen la fragmentación del ADN. Para evitar la acidificación intracelular bajo estas condiciones,

los reguladores de pH deben estar sobrerregulados en las células tumorales. Esto parece que se cumple en el COCE, puesto que la hipoxia también es un fenómeno característico de éste, como tumor sólido que es (11).

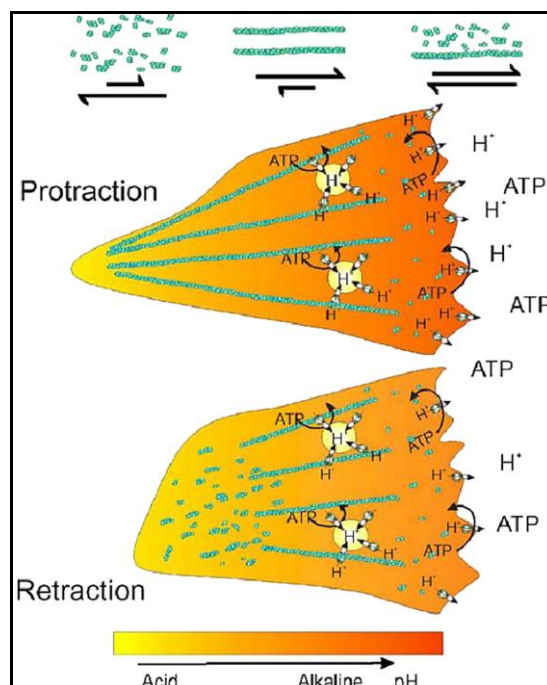


Figura 46. Mecanismo propuesto por el cual la sobreexpresión de pmV-ATPasas en la vanguardia de la célula, modula la migración/invasión. El modelo propuesto explica la necesidad de las pmV-ATPasas para adquirir un fenotipo invasivo y conseguir angiogénesis y metástasis. Un paso crítico para la migración, es la necesidad de actina asimétrica en forma de pseudopodios en el frente de avance (15).

Otero Rey et al., encuentra que el gen *ATP6V1C1* con su actividad como bomba de protones reguladora del pH, ampliamente descrita en relación al desarrollo y crecimiento en otros tipos de cáncer, también está relacionada con el COCE. Además observa que existe una relación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión de este gen y el tabaco (116).

B. QUIMIORRESISTENCIA

La resistencia a los agentes quimioterápicos es la causa principal de fracaso en el tratamiento de los pacientes con cáncer. El fenómeno de la resistencia a multidroga

(MDR) aparece en muchos tumores. El primer mecanismo que conduce a la aparición del fenotipo multirresistente es la sobreexpresión de transportadores expulsivos de fármacos en la membrana plasmática, como la glicoproteína-P (gp-P). Aunque en otros tumores, la MDR se asocia claramente a la expresión de la Pgp, en el COCE, como tumor sólido que es, el mecanismo por el que se produce la resistencia a los agentes quimioterápicos dentro del proceso multi-step, no está del todo claro (404).

Varios genes están relacionados con la MDR, multidrug resistance 1 (*mdr1*), multidrug resistance-associated protein (*MRP*), glutathione S-transferase- π (GST- π) y DNA topoisomerasa II (*topoII*). Sin embargo, existe la hipótesis de que la hipoxia y la acidez pueden contribuir a la progresión del crecimiento benigno hacia el maligno. Específicamente, el ambiente desfavorable puede inducir la selección de las células tumorales capaces de sobrevivir a las condiciones ácidas e hipóxicas. La acidez, en concreto ha sido relacionada con la resistencia a la quimioterapia (405), la proliferación (406) y el comportamiento metastásico (407). De hecho, un mecanismo de resistencia a las drogas citotóxicas, puede ser la alteración en el gradiente de pH entre el medio extracelular y el citoplasma celular (408).

La alteración del pH citosólico, también juega un papel importante en la quimiorresistencia. El pH extracelular de los tumores sólidos, es significativamente más ácido que el de los tejidos normales, lo que perjudica la absorción de los básicos fármacos quimioterápicos, reduciendo su efecto en los tumores (16,17). Martínez-Zaguilán et al., describen los mecanismos reguladores del pH_i en células quimiosensibles/quimiorresistentes de cáncer de pulmón. Los resultados afirman que ni el Na⁺/H⁺, ni el intercambio aniónico, se expresan de manera diferente en ambas líneas celulares. En ausencia de Na⁺ y de HCO₃⁻, las células quimiosensibles no se recuperan de la carga ácida, mientras que las quimiorresistentes sí (379). Según Becelli, el gradiente inverso de protones está directamente relacionado con la resistencia a agentes quimioterápicos (385). La recuperación del pH_i es inhibida por la bafilomicina A y el NBD-Cl, dos potentes inhibidores de las V-ATPasas (379).

Un importante determinante de la acidez del tumor, es el metabolismo anaerobio que permite la selección de células capaces de sobrevivir en un medio hipóxico-anaerobio mediante la síntesis de lactato. Sin embargo, este no es el mayor mecanismo

responsable del desarrollo del medio ácido en los tumores sólidos. Parece que una compleja estructura de interacciones proteína-proteína, proteína-lípido y lípido-lípido regula la homeostasis del pH en las células de los mamíferos. Las células tumorales malignas, parece que son capaces de secuestrar algunos de estos mecanismos y protegerse a ellas mismas del medio ácido, manteniendo la acidez que sería inapropiada para las células normales o más diferenciadas (409).

Estudios recientes, sugieren que las V-ATPasas que secretan protones a través de la membrana plasmática, pueden tener un papel clave en la acidificación del medio tumoral. Algunas células tumorales humanas se caracterizan por un incremento en la expresión y actividad de V-ATPasas, y el pretratamiento con inhibidores de la bomba de protones (PPI), sensibilizan a las estirpes celulares tumorales al efecto de los distintos medicamentos quimioterápicos (14,408-410).

La presencia de pmV-ATPasas no se puede localizar inmunohistoquímicamente en la membrana plasmática de las células quimiosensibles, lo que indica la hipótesis de que la actividad de las pmV-ATPasas es consecuencia del rápido intercambio ácido endomembrana (379). Parece que la efectividad del mecanismo de transporte de fármacos puede ser comparable con la extrusión farmacológica vía bombas secretoras como la gp-P, aunque el intercambio ácido de las vesículas (sobre todo las que presentan un sistema activo de intercambio H⁺/catión), puede ser un factor importante en la quimiorresistencia, especialmente en las células que no sobreexpresan en la membrana plasmática bombas secretoras tipo gp-P (411). En contraposición, Raghunand y Gillies, afirman que aunque la influencia de los inhibidores del tráfico vesicular se ha demostrado *in vitro*, sin embargo, los mecanismos que controlan la quimiorresistencia mediada por las vesículas debe ser testado *in vivo* para poder evaluar su eficacia y toxicidad (384).

Murakami et al., encuentran una sobreexpresión de todas las subunidades de las V-ATPasas en los tumores cisplatín-resistentes, aunque fundamentalmente del *ATP6C*, probablemente por la expresión temporal diferencial de las subunidades. En los tumores cisplatín-resistentes el pH celular era significativamente más alto que en las células sensibles (412). Sin embargo, Zhang et al., describen 38 genes sobreexpresados y 25 subexpresados en COCE cisplatín-resistentes. Los distintos métodos en la selección de

los genes candidatos pueden ser la explicación para que las subunidades de la V-ATPasa no aparezcan disregulados. En cualquier caso, describen una subexpresión del gen *ATP1B1*, gen que controla una de las subunidades de la NaK-ATPasa. Este hecho es consistente con los estudios que defienden a las V-ATPasas como principales controladoras del pH y del transporte de H⁺ en las células tumorales (413).

Torigoe et al., demuestran que el tratamiento con agentes anticancerígenos aumenta la expresión del gen *ATP6L* (subunidad c), aunque el cisplatino no induce actividad del promotor del gen *ATP6L*. Su hipótesis defiende que la expresión de V-ATPasas está sobreexpresada en respuesta a la acidosis celular y que la actividad del promotor de la subunidad c, es activada por los agentes anticancerígenos, sobre todo el inhibidor de la DNA-topoisomerasa II (TAS-103) (414). Estos datos sugieren que la inducción de la expresión de V-ATPasas en la MDR es una defensa anti-apoptótica y que los PPI en combinación con bajas dosis de quimioterápicos pueden ser una futura medida terapéutica (415).

Los PPI representan el tratamiento de elección para las enfermedades pépticas como el reflujo gastro-esofágico (416). Los PPIs bloquean la secreción de ácidos gástricos aunque también inhiben directamente las V-ATPasas. Éstos incluyen el omeprazol, esomeprazol, lansoprazol, pantoprazol y rabeprazol (417), los cuales se acumulan específicamente en los espacios ácidos (408).

El tratamiento con PPI ha sido asociado con una inhibición de la actividad de las V-ATPasas y un incremento del pH extracelular y del pH de las organelas lisosomales. Experimentos *in vivo* en trasplantes ratón/humano, muestran que el pretratamiento con PPI es capaz de sensibilizar a los tumores humanos sólidos a los fármacos quimioterápicos (408).

El tratamiento con inhibidores de la bomba de protones, induce una sensibilización de las células tumorales a los agentes quimioterápicos cisplatino, 5-fluoracilo y vinblastina, vía modificaciones en los gradientes del pH celular, consistente con la retención citoplasmática y en el núcleo de los citotóxicos, en el caso de la doxorubicina (408,410,418).

También es conocido que el pH bajo es una condición apropiada para la completa activación de los PPI (20). Estos hechos sugieren que la alcalinización del tumor representa un punto clave en futuras estrategias anticancerígenas (408-410). Los inhibidores específicos de las V-ATPasas como la concanamicina o la bafilomicina, también pueden ser fármacos a tener en cuenta no sólo para el tratamiento del cáncer, sino también para mejorar la MDR en los tumores (419).

C. V-ATPASA COMO DIANA TERAPÉUTICA.

El crecimiento de evidencias científicas, sugieren que el microambiente ácido tumoral, representa la llave del manejo del cáncer en cuanto a progresión y metástasis. Entre todos los mecanismos reguladores del micromedioambiente tumoral, las V-ATPasas juegan un papel fundamental por la posibilidad de su inhibición mediante técnicas de interferencia de RNA e inhibidores de la bomba de protones (420). Existen múltiples inhibidores de los reguladores del pH (Anexo III), pero los inhibidores de las V-ATPasas han demostrado ser los más eficientes, por ser éstas las máximas responsables del control del mismo (300,311).

Los primeros intentos de bloquear las V-ATPasas, se producen tras el descubrimiento en 1988 de la bafilomicina y la concanamicina (421). Moriyama et al., describen la inhibición de la actividad de la V-ATPasa como diana terapéutica, vía bloqueo del ensamblaje y reducción de la actividad secretora de H⁺, por el ácido fusídico y la suramina (422).

Posteriormente se han ido descubriendo nuevas moléculas capaces de inhibir en mayor o menor medida la V-ATPasa y con diferente mecanismo de acción. Entre ellas se encuentran el benzolactone enamides salicylihalamide (423), lobatamide A y B (424), apicularen (425), indolyls (426,427), oximidine (428), macrolactone archazolid (429), lobatamide C (430) y cruentaren(431). Entre los inhibidores de última generación se encuentran el NiK12192 (300,432), el FR202126 (433) y el PPI SB 242784 (434) (Anexo III).

De todas ellas, Boyd et al., encuentran que la bafilomicina y la concanamicina son las más potentes inhibidoras de las V-ATPasas y que incluso no discriminan entre V-ATPasas mamíferas y no mamíferas. Esta inhibición provoca una reducción del crecimiento de las células tumorales y de las líneas celulares con oncogenes transformados (435), a través de muerte celular mediada por apoptosis (436) y una reducción de los fenómenos metastásicos (399,400).

C.1. PAPEL DE LOS INHIBIDORES DE LAS V-ATPasas EN LA METÁSTASIS TUMORAL

El desarrollo y mantenimiento del gradiente de protones presente en los tumores, es debido directamente a la habilidad de las células tumorales a secretar protones (H^+) (311,398), acidificar el medio extracelular (12,13) y mantener alcalino el pH citosólico (15). Además el bajo pH puede promover la degradación y remodelación de la matriz extracelular (ECM) a través la activación de enzimas proteolíticas que contribuyen a la invasión y la metástasis cancerosa (407,437).

Las proteasas necesitan un bajo pH extracelular para optimizar su activación, incluyendo las *metaloproteinasas (MMP)*, *metaloproteinasas morfogenéticas ósea (proteína tipo 1)*, *proteasas serinas de tejidos* y *proteinasas adamalysin-relacionadas*. Entre ellas, las MMPs son proteasas esencialmente involucradas en la degradación y remodelación de todos los componentes estructurales de la ECM (438-442).

Sennoune et al., evaluaron el efecto de la bafilomicina A1 en células tumorales de cáncer de mama, observando una inhibición de la recuperación del pH citoplasmático en respuesta a la carga ácida, tanto en las células alta como bajamente metastáticas, aunque con mayor magnitud en las altamente metastáticas. Todo esto indica que las V-ATPasas localizadas en la membrana plasmática, están implicadas en la adquisición de un fenotipo más metastásico y que la aplicación de inhibidores de las V-ATPasas, permiten minimizar las metástasis a distancia (21).

Lu et al., demuestran la capacidad de retardar y suprimir las metástasis a distancia en el carcinoma hepatocelular humano in vitro, mediante la reducción de la extrusión de protones y de la actividad de la gelatinasa, vía inhibición de la subunidad c (*ATP6L*) de

las V-ATPasas, mediante técnicas de interferencia de RNA (22). Este hecho, es concordante con el bloqueo de la subunidad c, con bafilomicina y concanamicina, ya que éste es su principal lugar de unión a la V-ATPasa (443).

En las células de melanoma amelanótico tirosinasa positivos, la tirosinasa inactiva se acumula en el retículo endoplasmático, pues la presencia de V-ATPasas aberrantes impide el tráfico a través de la vía secretora. La utilización de inhibidores de la V-ATPasa, como la bafilomicina A1 o la concanamicina A, mejoran el transporte, demostrando la implicación de esta enzima y evitando las condiciones que favorecen la diseminación metastásica (444).

Con todo esto, las V-ATPasas representan *in vitro* e *in vivo* una diana en la terapéutica anticancerígena, directamente mediante la regulación del gradiente de pH en el medioambiente tumoral e indirectamente evitando la activación de las proteasas de la ECM (420).

C.2. PAPEL DE LOS INHIBIDORES DE LAS V-ATPasas EN EL CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS TUMORALES

Las V-ATPasas también pueden desempeñar un papel importante en la supervivencia de las células tumorales, a través de la regulación del pH y la prevención de la apoptosis. Como se ha descrito previamente, las V-ATPasas de la membrana plasmática ayudan a la regulación de pH citosólico en los macrófagos y neutrófilos (310). Este mecanismo también puede ser utilizado por las células tumorales, que experimentan una mayor producción de H^+ debido a la alta actividad glicolítica (445). El tratamiento con inhibidores de la V-ATPasa, provoca una disminución de la extrusión de H^+ , tanto *in vitro* como *in vivo* (446,447).

La bafilomicina A1, ha sido evaluada como un potencial agente anticancerígeno porque inhibe la proliferación celular y el crecimiento tumoral. Aunque este efecto se ha atribuido a la inhibición de la acidosis intracelular vía bloqueo de las V-ATPasas, el mecanismo exacto permanece desconocido (443). En un estudio de Lim et al., se plantea la hipótesis de que la bafilomicina A1 y su análogo, concanamicina A, estimulan un

factor de crecimiento tumoral, el factor de hypoxia-inducible 1α (*HIF-1 α*) (448). La interacción de la bafilomicina con el *HIF-1 α* , aumenta con la hipoxia, provocando una intensa inducción del gen *p21* que a su vez genera una detección del ciclo celular en las células cancerígenas (18).

El efecto *in vivo* de la bafilomicina en el crecimiento tumoral, ha sido evaluado previamente en tumores pancreáticos xenoinjertados (449). Mediante inyecciones de bafilomicina, observaron que se producía un retardo en el crecimiento en tumores mayores de 300 mm³. Sin embargo en fibrosarcomas, el efecto se puede detectar mucho más precozmente, probablemente en relación a los niveles de *HIF-1 α* . Lim et al., consideran que la bafilomicina inhibe el crecimiento de tumores grandes sometidos a niveles elevados de hipoxia más que en tumores pequeños, lo que explica el efecto dramático en tumores de 400 a 500 mm³ (18). Por lo tanto parece que la bafilomicina puede ser un potencial agente terapéutico para los tumores sólidos grandes.

La inhibición de las V-ATPasas, también ha demostrado que desencadena apoptosis a través de un mecanismo caspasa-dependiente (19,20). Bafilomicina y concanamycin, han demostrado inducir apoptosis en otros tipos de células, incluyendo los neutrófilos (450) y los osteoclastos (451).

Morimura et al., describen el efecto inhibidor del crecimiento mediante la estimulación de la apoptosis en el hepatoblastoma humano, mediante bafilomicina A1. En el análisis con microscopio electrónico, observaciones morfológicas y de citometría de flujo, revelaron un incremento del ratio de células apoptóticas y una disminución de la reproducción celular. Además, el análisis con chips de expresión genética, muestran que 3 de los 27 genes relacionados con las V-ATPasas, aparecen sobreexpresados (*ATP6V0D2*, *ATP6V1B1* y *ATP6V0A1*) en las células tratadas con bafilomicina A1. La inhibición del crecimiento celular en células hepáticas normales fue insignificante. Estos resultados apoyan la teoría de la inhibición de genes específicos de las V-ATPasas, con mínimos efectos sobre las células normales (23).

En el caso de células humanas de cáncer gástrico, Nakashima et al., investigan el mecanismo apoptótico inducido por la bafilomicina A1. Ésta, inhibe el crecimiento de células cancerígenas MKN-1, mediante apoptosis comprobada por el mecanismo de la

formación de la escalera de ADN y el método TUNEL. Mediante citometría de flujo, determinan alteraciones en el pH lisosómico, el cual aumenta en presencia de bafilomicina. La actividad de la caspasa-3 fue incrementada por la bafilomicina. Estos hallazgos, sugieren que la bafilomicina A1, induce apoptosis en células MKN-1 mediada por proteasas liberadas tras una disfunción lisosomal, seguido de una activación de la caspasa-3 de manera citocromo-c-independiente (452,453).

En un estudio de Wu et al., demuestran que el tratamiento con bafilomicina A1, suprime la macroautofagia, mediante la prevención de la acidificación de los lisosomas (24). La macroautofagia es una vía degradatoria de proteínas que permite aumentar la supervivencia celular en situaciones de estrés y también en las células cancerígenas (454,455). La inhibición de la macroautofagia en las células HT-29, HCT-116 y SW1116 del cáncer de colon, se acompaña de una regulación a la baja de la ciclina D y E y una regulación al alta de $p21^{Cip1}$ y varias caspasas, provocando un efecto antiproliferativo (24).

Es bien conocido que la termosensibilidad de las células tumorales puede verse incrementada mediante la disminución del pH intracelular, inhibiendo los mecanismos homeostáticos de éste, principalmente controlados por las V-ATPasas (300,386,456). Hayashi et al., concluyen que el tratamiento de células de cáncer humano pancreático (células AsPC-1) con bafilomicina A1 en combinación con EIPAs (inhibidores de la bomba de intercambio Na^+/H^+), provoca una disminución del pH intracelular y un incremento en la termosensibilidad de las células cancerígenas, que favorece un retraso en el crecimiento celular (457).

Las células cancerígenas expresan más V-ATPasas en comparación con las células normales, provocando alteraciones en el micromedioambiente ácido que afectan significativamente al crecimiento e infiltración de las células cancerígenas (12,13,300). Las células neoplásicas, son más sensibles a la bafilomicina A1 que las células normales, hecho que puede utilizarse en la terapia anticancerígena (458).

El *ATP6L*, o subunidad c del dominio V0, ha sido determinada en estudios recientes como una posible diana en la supresión de metástasis y crecimiento tumoral vía inhibición de la V-ATPasa, con el objetivo de alterar el micromedioambiente ácido de la

matriz extracelular, necesario para la actividad de muchas MMPs y proteasas (14,22,152,300).

Ohta y cols., observan que la subunidad c de la V-ATPasa, aparece sobreexpresada en tumores pancreáticos invasivos en comparación con tumores benignos o no invasivos, sugiriendo que la V-ATPasa puede tener un papel fundamental en la progresión del tumor. (459).

Lu et al., demuestran la capacidad de retardar el crecimiento tumoral y suprimir las metástasis a distancia en el carcinoma hepatocelular humano, mediante la reducción de la extrusión de protones y de la actividad de la gelatinasa vía inhibición de la subunidad c (*ATP6L*) mediante técnicas de interferencia de RNA (22).

Parece también, que la presencia de *ATP6L*, genera un efecto protector contra la citotoxicidad peróxido-inducida, inhibiendo la muerte celular autofágica en las células gliomales (460). Por otro lado, Philippe y cols., no han encontrado sobreexpresión de subunidades de V-ATPasa en los gliomas proliferativos, siendo los niveles de ARNm de la subunidad V-ATPasa similares en los gliomas humanos (grado II ó IV) y en tejidos peritumorales (323).

Se ha visto que la oncoproteína E5 del papilomavirus bovino se une con la subunidad c del dominio V0 de V-ATPasa (461,462), desencadenando dicha unión una alcalinización del Golgi que se correlaciona con la transformación celular inducida por dicha proteína(463); por lo que el bloqueo de la V-ATPasa vía inhibición de la subunidad c podría eliminar los efectos carcinogénicos del VPH.

Parece que la concanamicina A, se une a la subunidad c del dominio V0 (464) así como la bafilomicina (465). Según Schoonderwoert et al., las células intermedias de la pituitaria tratadas con bafilomicina A, sufren una reducción de los gránulos secretorios densos y de las estructuras vacuolares del area trans-golgi (307). Según Bowman et al., las mutaciones en la secuencia genómica de la subunidad c (se han encontrado cuatro mutaciones: T32I, F136L, Y143H e Y143N), confieren a la célula la capacidad de resistencia a la bafilomicina A1; parece que dos de estas mutaciones se corresponden con la posición de las mutaciones oligomicin-resistentes en las homólogas F1F0

sintasas, sugiriendo la utilización del mismo receptor por parte de estas dos moléculas (466). Zhang et al., encuentran que el sitio de unión de la bafilomicina reside en la subunidad 10 kDa (467). Sin embargo, Otero Rey et al., encuentran que *ATP6V0C*, no se encuentra sobreexpresada en el COCE de manera estadísticamente significativa, por lo que el bloqueo de este gen no parece ser de gran utilidad en este tipo de tumores (11).

Sin embargo no parece que ninguno de estos inhibidores sea de utilidad demostrada en el COCE, por lo que es muy importante realizar más estudios, para determinar la verdadera implicación de las V-ATPasas en el desarrollo del cáncer y la aplicación de otros inhibidores de las subunidades encargadas del ensamblaje de la enzima (300). La implicación de la subunidad C del dominio V1 en la función enzimática de las V-ATPasas, avala la necesidad de seguir investigando inhibidores específicos de dicha subunidad con el fin de controlar las consecuencias del COCE. Estudios previos sugieren que las células que expresan niveles elevados de subunidad C, presentan una mayor resistencia a los agentes quimioterápicos, por lo que puede ser una posible diana en la terapéutica anticancerígena (468). Las V-ATPasas, por lo tanto, son un blanco potencial para el incremento de la sensibilidad de los tumores a las drogas (469).

Por todos estos motivos, consideramos de suma importancia, ahondar en la investigación del gen *ATP6V1C1*, como máximo responsable del control de las V-ATPasas, implicadas en procesos tan importantes como el pH de los tumores sólidos, la selección de células tumorales más agresivas y metastásicas, en la quimiorresistencia, así como la posibilidad de utilizarlas como diana terapéutica.

VI.- CONCLUSIONES

1. Se observa una sobreexpresión del gen *ATP6V1C1* en el COCE de una manera estadísticamente significativa con respecto a los controles sanos, mediante PCR-qRT, en muestras obtenidas mediante citología exfoliativa.
2. La expresión inmunohistoquímica de la subunidad C1 se localiza fundamentalmente en las células epiteliales en biopsias de la mucosa oral normal y en las células neoplásicas en el COCE. La intensa tinción encontrada en el COCE en comparación con el epitelio oral normal, también explica la sobreexpresión de la subunidad C1.
3. Existe una relación estadísticamente significativa y con gradiente de incrementación, entre los niveles de expresión de *ATP6V1C1* y el estadio tumoral.
4. El análisis mediante curvas ROC indica que la determinación de los niveles de expresión de *ATP6V1C1*, constituye un método diagnóstico altamente sensible y específico para la discriminación entre muestras de COCE y de mucosa oral normal.
5. Con las limitaciones derivadas de un estudio preliminar, esta tesis doctoral constituye una base fundamental y necesaria para poder determinar la eficacia de la determinación de los niveles de *ATP6V1C1* en el diagnóstico precoz del COCE, a través de la identificación de lesiones precancerosas, así como la posibilidad de minimizar los fenómenos metastásicos y la MDR mediante inhibidores específicos de las V-ATPasas.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

- (1) Parkin DM, Laara E, Muir CS. Estimate of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int.J.Cancer* 1988 Feb;41(2):184-97.
- (2) Sudbo J. Novel management of oral cancer: a paradigm of predictive oncology. *Clin.Med.Res.* 2004 Nov;2(4):233-42.
- (3) Boyd NM, Reade PC. Mechanisms of carcinogenesis with particular reference to the oral mucosa. *J.Oral Pathol.* 1988 May;17(5):193-201.
- (4) Choi S, Myers JN. Molecular Pathogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma: Implications for Therapy. *J.Dent.Res.* 2008 Jan;87(1):14-32.
- (5) Poh CF, Ng S, Berean KW, Williams PM, Rosin MP, Zhang L. Biopsy and histopathologic diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J.Can.Dent.Assoc.* 2008 Apr;74(3):283-8.
- (6) Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, Von Eggeling F, Muller-Richter U, Kosmehl H, et al. Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *J.Dtsch.Dermatol.Ges.* 2007 Dec;5(12):1095-100.
- (7) Navone R, Burlo P, Pich A, Pentenero M, Broccoletti R, Marsico A, et al. The impact of liquid-based oral cytology on the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma. *Cytopathology* 2007 Dec;18(6):356-60.
- (8) Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Mol.Cancer.* 2006 Mar;5:11.
- (9) Acha A, Ruesga MT, Rodríguez MJ, Martínez de Pancorbo MA, Aguirre JM. Applications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and precancer. *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal* 2005 Mar-Apr;10(2):95-102.
- (10) Somoza JM, García A, Barros F, Otero E, Torres M, Gándara P, et al. Gene expression profile in oral squamous cell carcinoma: a pilot study. *J.Oral Maxillofac.Surg.* 2005 Jun;63(6):786-92.
- (11) Otero EM, Somoza M, Barros F, García A. Intracellular pH regulation in oral squamous cell carcinoma is mediated by increased V-ATPase activity via over-expression of the *ATP6V1C1* gene. *Oral Oncol.* 2008 Feb;44(2):193-9.
- (12) Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ. The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nat.Rev.Cancer* 2005 Oct;5(10):786-95.
- (13) Perona R, Serrano R. Increased pH and tumorigenicity of fibroblasts expressing a yeast proton pump. *Nature* 1988 Aug;334(6181):438-40.

-
- (14) Sennoune SR, Luo D, Martínez-Zaguilan R. Plasmalemmal vacuolar-type H⁺-ATPase in cancer biology. *Cell Biochem.Biophys.* 2004 Feb;40(2):185-206.
- (15) Sennoune SR, Martínez-Zaguilan R. Plasmalemmal vacuolar H⁺-ATPases in angiogenesis, diabetes and cancer. *J.Bioenerg.Biomembr.* 2007 Dec;39(5-6):427-33.
- (16) Griffiths JR. Are cancer cells acidic? *Br.J.Cancer* 1991 Sep;64(3):425-7.
- (17) Negendank W. Studies of human tumors by MRS: a review. *NMR Biomed.* 1992 Sep-Oct;5(5):303-24.
- (18) Lim JH, Park JW, Kim MS, Park SK, Johnson RS, Chun YS. Bafilomycin induces the p21-mediated growth inhibition of cancer cells under hypoxic conditions by expressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol.Pharmacol.* 2006 Dec;70(6):1856-65.
- (19) Aiko K, Tsujisawa T, Koseki T, Hashimoto S, Morimoto Y, Amagasa T, et al. Involvement of cytochrome c and caspases in apoptotic cell death of human submandibular gland ductal cells induced by concanamycin A. *Cell.Signal.* 2002 Aug;14(8):717-22.
- (20) De Milito A, Iessi E, Logozzi M, Lozupone F, Spada M, Marino ML, et al. Proton pump inhibitors induce apoptosis of human B-cell tumors through a caspase-independent mechanism involving reactive oxygen species. *Cancer Res.* 2007 Jun;67(11):5408-17.
- (21) Sennoune SR, Bakunts K, Martínez GM, Chua-Tuan JL, Kebir Y, Attaya MN, et al. Vacuolar H⁺-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 2004 Jun;286(6):C1443-52.
- (22) Lu X, Qin W, Li J, Tan N, Pan D, Zhang H, et al. The Growth and Metastasis of Human Hepatocellular Carcinoma Xenografts Are Inhibited by Small Interfering RNA Targeting to the Subunit ATP6L of Proton Pump. *Cancer Res.* 2005 Aug;65(15):6843-9.
- (23) Morimura T, Fujita K, Akita M, Nagashima M, Satomi A. The proton pump inhibitor inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoblastoma. *Pediatr.Surg.Int.* 2008 Oct;24(10):1087-94.
- (24) Wu YC, Wu WKK, Li Y, Yu L, Li ZJ, Wong CCM, et al. Inhibition of macroautophagy by bafilomycin A1 lowers proliferation and induces apoptosis in colon cancer cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2009 May;382(2):451-6.

- (25) Gruber G. Structural features and nucleotide-binding capability of the C subunit are integral to the regulation of the eukaryotic V1Vo ATPases. *Biochem.Soc.Trans.* 2005 Aug;33(Pt 4):883-5.
- (26) Armbruster A, Hohn C, Hermesdorf A, Schumacher K, Borsch M, Gruber G. Evidence for major structural changes in subunit C of the vacuolar ATPase due to nucleotide binding. *FEBS Lett.* 2005 Mar;579(9):1961-7.
- (27) Inoue T, Forgac M. Cysteine-mediated Cross-linking Indicates That Subunit C of the V-ATPase Is in Close Proximity to Subunits E and G of the V1 Domain and Subunit a of the V0 Domain. *J.Biol.Chem.* 2005 Jul;280(30):27896-903.
- (28) Forgac M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2007 Nov;8(11):917-29.
- (29) Vitavska O, Wieczorek H, Merzendorfer H. A Novel Role for Subunit C in Mediating Binding of the H⁺-V-ATPase to the Actin Cytoskeleton. *J.Biol.Chem.* 2003 May;278(20):18499-505.
- (30) Binelfa LF, García JCS. Bases genéticas y moleculares del cáncer/2a. parte. *Gaceta Mexicana de Oncología Sociedad Mexicana de Oncología* 2005 Feb;4(3):76-81.
- (31) Wood NK. *Diagnostico Diferencial de Las Lesiones Orales Y Maxilofaciales*. 5^a ed. Madrid: Harcourt Brace; 2005.
- (32) García A, Ceballos A, Gándara JM. Cáncer Oral. En: *Medicina Bucal Práctica*. 1^a ed. Santiago de Compostela: Danú; 2000. p. 355-369.
- (33) Moore SR, Pierce AM, Wilson DF. 'Oral cancer'--the terminology dilemma. *Oral Dis.* 2000 May;6(3):191-93.
- (34) Kleinman DV, National Institutes of Health (US), Centers for Disease Control (US). *Cancers of the Oral Cavity and Pharynx: A Statistics Review Monograph, 1973-1987 / developed by U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service ; Centers for Disease Control (CDC) ; National Institutes of Health (NIH) ; contributing editors, Dushanka V. Kleinman, et al. U.S. DHHS, PHS, CDC ; NIH, Atlanta, GA : Bethesda, MD : 1991.*
- (35) Pindborg JJ, Kiaer J, Gupta PC, Chawla TN. Studies in oral leukoplakias. Prevalence of leukoplakia among 10,000 persons in Lucknow, India, with special reference to use of tobacco and betel nut. *Bull.World Health Organ.* 1967 Feb;37(1):109-16.
- (36) Pindborg JJ. Clinical relevance of precancerous lesions of oral mucosa. *Recent Results Cancer Res.* 1994 Mar;134:9-16.

- (37) Frías M, Zeichner I, Súchil L, Ochoa FJ. Epidemiología descriptiva del cáncer de cavidad bucal en el Instituto Nacional de Cancerología (1985-1992). *Rev.Inst.Nac.Cancerol.(Méx.)* 1997 Apr;43(2):80-5.
- (38) Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer.J.Clin.* 2000 Jan-Feb;50(1):7-33.
- (39) Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer Statistics, 2008. *CA Cancer J.Clin.* 2008 Mar;58(2):71-96.
- (40) Zakrzewska JM. Oral cancer. *BMJ. British Medical Journal (International ed.)* 1999 May;318(7190):1051-4.
- (41) Escoda CG, Aytés LB, Algarra EA, Salinas MB, Albiol JG, et al. *Patología Quirúrgica Bucal*. 3º ed. Madrid: Ergon; 1999.
- (42) Barasch A, Gofa A, Krutchkoff DJ, Eisenberg E. Squamous cell carcinoma of the gingiva. A case series analysis. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 1995 Aug;80(2):183-7.
- (43) Silverman S,Jr. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. *J.Am.Dent.Assoc.* 2001 Nov;132 Suppl:7S-11S.
- (44) Burzynski NJ, Flynn MB, Faller NM, Ragsdale TL. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract in patients 40 years of age and younger. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.* 1992 Sep;74(3):404-8.
- (45) Hindle I, Nally F. Oral cancer: a comparative study between 1962-67 and 1980-84 in England and Wales. *Br.Dent.J.* 1991 Jan;170(1):15-20.
- (46) Bagán JV, Scully C. Recent advances in Oral Oncology 2007: Epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication. *Oral Oncol.* 2008 Feb;44(2):103-8.
- (47) Garavello W, Spreafico R, Gaini RM. Oral tongue cancer in young patients: a matched analysis. *Oral Oncol.* 2007 Oct;43(9):894-7.
- (48) Stolk-Liefferink SAH, Dumans AG, van der Meij EH, Knegt PP, van der Wal KGH. Oral squamous cell carcinoma in children; review of an unusual entity. *Int.J.Ped.Otorhinolaryngol.* 2008 Jan;72(1):127-31.
- (49) Diniz M. Carcinoma oral de células escamosas: evaluación pronóstica de variables clínicas, histológicas e inmunohistoquímicas [tesis doctoral]. Santiago de Compostela: Servicio de Publicacións e Intercambio Científico. Universidad de Santiago de Compostela; 2005.
- (50) Neville BW, Day TA. Oral Cancer and Precancerous Lesions. *CA Cancer J.Clin.* 2002 Mar;52(4):195-215

- (51) Kothari RK, Ghosh A, Bhattacharyya SK, Ghosh SK. Adenosquamous carcinoma of oral cavity: a case report. *J.Indian Med.Assoc.* 2007 Sep;105(9):531-2.
- (52) Haya MC, Bagan JV, Murillo J, Poveda R, Calabuig C. The prevalence of oral leukoplakia in 138 patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* 2004 Nov;10(6):346-8.
- (53) Ceballos A, Bullón P, Gándara JM, Chimenos E, Blanco A, Martínez-Sahuquillo A, et al. *Medicina Bucal Práctica*. 1ª ed. Santiago de Compostela: Danú; 2000. p. 355-68.
- (54) Regezi JA, Sciubba JJ. *Patología Bucal Correlaciones clinicopatológicas*. 2ª ed. Edic.México, DF, McGrawHill Interamericana; 2000.
- (55) Gorsky M, Epstein JB, Oakley C, Le ND, Hay J, Stevenson-Moore P. Carcinoma of the tongue: a case series analysis of clinical presentation, risk factors, staging, and outcome. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 2004 Nov;98(5):546-52.
- (56) Joseph BK. Oral cancer: prevention and detection. *Med.Princ.Pract.* 2002 Feb;11 Suppl.1:32-5.
- (57) Sciubba JJ. Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. *Am.J.Clin.Dermatol.* 2001 Jun;2(4):239-51.
- (58) Pathak KA, Mathur N, Talole S, Deshpande MS, Chaturvedi P, Pai PS, et al. Squamous cell carcinoma of the superior gingival–buccal complex. *Oral Oncol.* 2007 Sep;43(8):774-9.
- (59) Fleming ID, Cooper JS, Henson DE. American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 24-30.
- (60) La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol.* 1997 Sep;33(5):302-12.
- (61) Bundgaard T, Bentzen SM, Wildt J. The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in intra-oral squamous cell carcinoma. *Eur.J.Cancer.B.Oral Oncol.* 1994 Sep;30B(5):323-8.
- (62) Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *Int.J.Cancer* 1989 Jun;43(6):992-1000.
- (63) Mignogna MD, Fedele S, Lo Russo L. The World Cancer Report and the burden of oral cancer. *Eur.J.Cancer Prev.* 2004 Apr;13(2):139-42.
- (64) Prieto I, Prieto A, Bascones A. Cáncer oral. *Medicina clínica (Ed.impresa)* 2006 Mar;127(7):258-64.

- (65) Jiménez Y, Milián MA, Gavalda E, Gallud MD, Haya C. Lesiones erosivas y ulceradas de la mucosa oral. Disponible en: <http://www.icoev.es/oris/58-1/lesiones.pdf>. Accedida el 22/02/08.
- (66) Jin Z, Gao F, Flagg T, Deng X. Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone promotes functional cooperation of Bcl2 and c-Myc through phosphorylation in regulating cell survival and proliferation. *J.Biol.Chem.* 2004 Sep;279(38):40209-19.
- (67) Scully C, Bagán JV. Recent advances in Oral Oncology. *Oral Oncol.* 2007 Feb;43(2):107-15.
- (68) Sciubba JJ. Oral cancer and its detection. History-taking and the diagnostic phase of management. *J.Am.Dent.Assoc.* 2001 Nov;132 Suppl:12S-18S.
- (69) Bagán JV, Jiménez Y, Murillo J, Poveda R, Díaz JM, Gavalda C, et al. Epstein-Barr virus in oral proliferative verrucous leukoplakia and squamous cell carcinoma: A preliminary study. *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal* 2008 Feb;13(2):E110-3.
- (70) Anaya G, Ramirez V, Irigoyen ME, García CM, Guido M, Méndez R, et al. High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study. *Arch.Med.Res.* 2008 Feb;39(2):189-97.
- (71) Hansson BG, Rosenquist K, Antonsson A, Wennerberg J, Schildt EB, Bladstrom A, et al. Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol.* 2005 Dec;125(12):1337-44.
- (72) Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 1996 Jul;82(1):57-68.
- (73) Pintos J, Black MJ, Sadeghi N, Ghadirian P, Zeitouni AG, Viscidi RP, et al. Human papillomavirus infection and oral cancer: a case-control study in Montreal, Canada. *Oral Oncol.* 2008 Mar;44(3):242-50.
- (74) Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L, et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann.Oncol.* 2008 Oct;19(10):1681-90.
- (75) Skolnick J, Murphy J, Hunt JL. Microsatellite instability in nasopharyngeal and lymphoepithelial carcinomas of the head and neck. *Am.J.Surg.Pathol.* 2006 Oct;30(10):1250-3.

- (76) Scully C, Cawson R. Potentially malignant oral lesions. *J.Epidemiol.Biostat.* 1996 Mar;1:3-12.
- (77) Rodríguez MJ, Schneider J, Moragues MD, Martínez R, Ponton J, Aguirre JM. Cross-reactivity between *Candida albicans* and oral squamous cell carcinoma revealed by monoclonal antibody C7. *Anticancer Res.* 2007 Sep-Oct;27(5B):3639-43.
- (78) Rautemaa R, Hietanen J, Niissalo S, Pirinen S, Perheentupa J. Oral and oesophageal squamous cell carcinoma--a complication or component of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED, APS-I). *Oral Oncol.* 2007 Jul;43(6):607-13.
- (79) Hooper SJ, Crean SJ, Fardy MJ, Lewis MA, Spratt DA, Wade WG, et al. A molecular analysis of the bacteria present within oral squamous cell carcinoma. *J.Med.Microbiol.* 2007 Dec;56(Pt 12):1651-59.
- (80) Vairaktaris E, Spyridonidou S, Goutzanis L, Vylliotis A, Lazaris A, Donta I, et al. Diabetes and oral oncogenesis. *Anticancer Res.* 2007 Nov-Dec;27(6B):4185-93.
- (81) Bloching M, Reich W, Schubert J, Grummt T, Sandner A. The influence of oral hygiene on salivary quality in the Ames Test, as a marker for genotoxic effects. *Oral Oncol.* 2007 Oct;43(9):933-9.
- (82) Aguirre JM Cáncer Oral. En: Bascones A, editor. *Tratado de Odontología*. 3.^a ed. Madrid: Avances; 2000. p. 3091-3114.
- (83) Nieto A, Ramos MR. Rising trends in oral cancer mortality in Spain, 1975-94. *J.Oral Pathol.Med.* 2002 Mar;31(3):147-52.
- (84) Beenken SW, Krontiras H, Maddox WA, Peters GE, Soong S, Urist MM. T1 and T2 squamous cell carcinoma of the oral tongue: prognostic factors and the role of elective lymph node dissection. *Head Neck* 1999 Mar;21(2):124-30.
- (85) Rautava J, Luukkaa M, Heikinheimo K, Alin J, Grenman R, Happonen RP. Squamous cell carcinomas arising from different types of oral epithelia differ in their tumor and patient characteristics and survival. *Oral Oncol.* 2007 Oct;43(9):911-9.
- (86) Spencer KR, Ferguson JW, Wiesenfeld D. Current concepts in the management of oral squamous cell carcinoma. *Aust.Dent.J.* 2002 Dec;47(4):284-9; quiz 351.
- (87) Day TA, Davis BK, Gillespie MB, Joe JK, Kibbey M, Martin-Harris B, et al. Oral cancer treatment. *Curr.Treat.Options Oncol.* 2003 Feb;4(1):27-41.
- (88) Cheng A, Cox D, Schmidt BL. Oral squamous cell carcinoma margin discrepancy after resection and pathologic processing. *J.Oral Maxillofac.Surg.* 2008 Mar;66(3):523-9.

- (89) Liao CT, Chang JT, Wang HM, Ng SH, Hsueh C, Lee LY, et al. Analysis of risk factors of predictive local tumor control in oral cavity cancer. *Ann.Surg.Oncol.* 2008 Mar;15(3):915-22.
- (90) Dunne AA, Folz BJ, Kuropkat C, Werner JA. Extent of surgical intervention in case of N0 neck in head and neck cancer patients: an analysis of data collection of 39 hospitals. *Eur.Arch.Otorhinolaryngol.* 2004 Jul;261(6):295-303.
- (91) Ord RA, Blanchaert RH.Jr. Current management of oral cancer. A multidisciplinary approach. *J.Am.Dent.Assoc.* 2001 Nov;132 Suppl:19S-23S.
- (92) Howaldt HP, Kainz M, Euler B, Vorast H. Proposal for modification of the TNM staging classification for cancer of the oral cavity. DOSAK. *J.Craniomaxillofac.Surg.* 1999 Oct;27(5):275-88.
- (93) Bankfalvi A, Piffko J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. *J.Oral Pathol.Med.* 2000 Mar;29(7):291-98.
- (94) Lyons A. Current concepts in the management of oral cancer. *Dent.Update* 2006 Nov;33(9):538-9, 542-5.
- (95) Scully C, Bagán JV. Recent advances in Oral Oncology 2007: Imaging, treatment and treatment outcomes. *Oral Oncol.* 2008 Mar;44(3):211-5.
- (96) Duarte JJ. Aspectos clínicos y tratamiento de la xerostomía. *Acta Otorrinolaringol.Cir. Cabeza cuello.* 2005 May;33(1):14-20.
- (97) Hill BT, Price LA. Lack of survival advantage in patients with advanced squamous cell carcinomas of the oral cavity receiving neoadjuvant chemotherapy prior to local therapy, despite achieving an initial high clinical complete remission rate. *Am.J.Clin.Oncol.* 1994 Feb;17(1):1-5.
- (98) Lin JC, Jan JS, Hsu CY, Wong DY. High rate of clinical complete response to weekly outpatient neoadjuvant chemotherapy in oral carcinoma patients using a new regimen of cisplatin, 5-fluorouracil, and bleomycin alternating with methotrexate and epirubicin. *Cancer* 1999 Apr;85(7):1430-8.
- (99) Andreadis C, Vahtsevanos K, Sidiras T, Thomaidis I, Antoniadis K, Mouratidou D. 5-Fluorouracil and cisplatin in the treatment of advanced oral cancer. *Oral Oncol.* 2003 Jun;39(4):380-5.
- (100) Martín EV. Conceptos importantes sobre inmunizaciones. *Acta Méd.Per.* 2007 Apr;24(1):59-64.
- (101) Barquet A. Terapia antiangiogénica. *Arch.Soc.Esp.Oftalmol.* 2005 Jun;80(8):435-436.

- (102) García V, González MA, Bascones A. Bases moleculares del cáncer oral. Revisión bibliográfica. Avances en Odontoestomatología 2005 Jan;21(6):287-95.
- (103) Bascones A, Seoane J, Aguado A, Quintanilla J. Cáncer y Precáncer oral. En: Bases Clínico-Quirúrgicas y Moleculares. 1ª ed. Madrid: Avances Médico-Dentales; 2003. p. 113-124.
- (104) Díaz LDL, Cala OLO, Pinto COB, Lizcano AIG. El ciclo celular. Medunab 2003 Aug;6(16):21-9.
- (105) Aguirre A. Guía práctica del ciclo celular y mitosis. 8ª ed. Norma, Cali; 2000. p. 651-76.
- (106) Nishitani H, Lygerou Z. Control of DNA replication licensing in a cell cycle. Genes Cells 2002 Jun;7(6):523-34.
- (107) Peralta O, Bahena M, Madrid V. Regulación del ciclo celular y desarrollo del cáncer: perspectivas terapéuticas. Salud Pública Mex. 1997 Sep;39(5):451-62.
- (108) Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK 4. Nature 1993 Sep;366(6456):704-7.
- (109) Kupferman ME, Myers JN. Molecular Biology of Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. Otolaryngol.Clin. North America 2006 Apr;39(2):229-47.
- (110) Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, et al. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 2004 Sep;101(39):14228-33.
- (111) Pérez JCR. Las Bases Moleculares del Cáncer. Acta Universitaria 2006 Dec;16(1):40-9.
- (112) De Sousa FACG. Alterações gênicas e câncer bucal-uma breve revisão. Rev.Brasil.Patol. Oral 2004 Jan;3(1):20-5.
- (113) Sidransky D. Molecular markers in cancer diagnosis. J.Natl.Cancer.Inst.Monogr. 1995 Apr;(17):27-9.
- (114) Todd R, Donoff RB, Wong DT. The molecular biology of oral carcinogenesis: toward a tumor progression model. J.Oral Maxillofac.Surg. 1997 Jun;55(6):613-23; discussion 623-5.
- (115) Williams HK. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. Mol.Pathol. 2000 Aug;53(4):165-72.
- (116) Otero EM. Validación y estudio de la implicación de los genes *ADRBK2*, *ADRB1*, *ADRA2B*, *AXIN 2*, *ATP6VIC1* y *ATP6V0E*, en el carcinoma oral de células escamosas mediante pcr cuantitativa en tiempo real [tesis doctoral]. Santiago de Compostela:

Servicio de Publicacións e Intercambio Científico. Universidad de Santiago de Compostela; 2006.

(117) Meza J, Montaña A, Aguayo A. Bases moleculares del cáncer. *Rev.Invest.Clín.* 2006 Ene-feb;58(1):56-70.

(118) López-Martínez M, Anzola M, Cuevas N, Aguirre JM, Martínez de Pancorbo M. Aplicaciones clínicas del diagnóstico de las alteraciones de p53 en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello. *Med.Oral* 2002 May;7:108-120.

(119) Moles MAG. Tumores malignos de la mucosa oral. Bagán Sebastián JV, Ceballos Salobreña A, Bermejo Fenoll A, Aguirre Urizar JM y Peñarrocha Diego M. *Medicina Oral.* Barcelona: Masson; 1995. p. 186-201.

(120) Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997 Apr;386(6627):761-3.

(121) Schoelch ML, Regezi JA, Dekker NP, Ng IO, McMillan A, Ziober BL, et al. Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 1999 May;35(3):333-42.

(122) González MA, Ruíz I, Martínez JA, Gil JA, Esteban F, González S, et al. P21WAF1/CIP1 protein and tongue cancer prognosis. *Anticancer Res.* 2004 Sep-Oct;24(5B):3225-31.

(123) González MA, Gil JA, Ruíz- I, Esteban F, Delgado M, Bascones A. Prognostic significance of p21WAF1/CIP1, p16INK4a and CD44s in tongue cancer. *Oncol.Rep.* 2007 Aug;18(2):389-96.

(124) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 Mutations in Human Cancer Science 1991 Jul;253(5015):49-53.

(125) Castañeda DB, González PA, Ortega MRR, Torres HIZ. Proteína p53: sinais e o papel no processo de carcinogênese. *Rev.Cir.Traumatol.Buco-Maxilo-Fac.* 2007 Sep;7(2):14-21.

(126) Vairaktaris E, Spyridonidou S, Papakosta V, Vylliotis A, Lazaris A, Perrea D, et al. The hamster model of sequential oral oncogenesis. *Oral Oncol.* 2008 Apr;44(4):315-324.

(127) Carlos de Vicente J, Junquera LM, Zapatero AH, Fresno MF, Hernández G, López JS. Prognostic significance of p53 expression in oral squamous cell carcinoma without neck node metastases. *Head Neck* 2004 Jan;26(1):22-30.

- (128) De Oliveira LR, Ribeiro-Silva A, Zucoloto S. Prognostic impact of p53 and p63 immunoexpression in oral squamous cell carcinoma. *J.Oral Pathol.Med.* 2007 Apr;36(4):191-7.
- (129) Jones P, Altamura S, Boueres J, Ferrigno F, Fonsi M, Giomini C, et al. Discovery of 2-{4-[(3S)-Piperidin-3-yl]phenyl}-2H-indazole-7-carboxamide (MK-4827): A Novel Oral Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) Inhibitor Efficacious in BRCA-1 and -2 Mutant Tumors *J.Med.Chem.* 2009 Nov;52(22):7170-85.
- (130) van Heerden WF, Swart TJ, van Heerden MB, van Rensburg EJ, Engelbrecht S, Dreyer L, et al. Immunohistochemical evaluation of Fhit protein expression in oral squamous cell carcinomas. *J.Oral Pathol.Med.* 1999 Nov;28(10):433-7.
- (131) van Heerden WF, Swart TJ, Robson B, Smith TL, Engelbrecht S, van Heerden MB, et al. FHIT RNA and protein expression in oral squamous cell carcinomas. *Anticancer Res.* 2001 Jul-Aug;21(4A):2425-8.
- (132) Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989 Nov;246(4930):603-8.
- (133) Grander D. How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer? *Med.Oncol.* 1998 Apr;15(1):20-6.
- (134) Hall PA, Woods AL. Immunohistochemical markers of cellular proliferation: achievements, problems and prospects. *Cell Tissue Kinet.* 1990 Nov;23(6):505-22.
- (135) Binelfa LF, García JCS. Bases genéticas y moleculares del cáncer/1a. parte. *Gaceta Mex.Oncol Soc.Mex.Oncol* 2005 Sep;4(2):42-7.
- (136) Suzuki D, Griffiths A, Miller J, Lewontin R. *An Introduction to Genetic Analysis.* 4th ed. Columbia: Hardcover; 1986.
- (137) Otero EM, García A, Barros F, Torres M, Gándara JM, Somoza M. DNA microarrays in oral cancer. *Med.Oral.* 2004 Aug-Oct;9(4):288-92.
- (138) Preuss SF, Weinell A, Molitor M, Stenner M, Semrau R, Drebber U, et al. Nuclear survivin expression is associated with HPV-independent carcinogenesis and is an indicator of poor prognosis in oropharyngeal cancer. *Br.J.Cancer* 2008 Feb;98(3):627-32.
- (139) Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Patología estructural y funcional.* 7ª ed. México: Nueva Editorial Interamericana; 2005.
- (140) Trapero JC, Sánchez JC, Durán ML, Sánchez BP, Gutiérrez JJS, Martínez AB. Marcadores de senescencia celular en cáncer y precáncer oral. *Av.Odontoestomatol.* 2008 Jan;24(1):69-80.

- (141) Andreu GP, Hernández RD. Senescencia celular y envejecimiento. *Rev.Cubana Invest.Biomed.* 2003 Feb;22(3):204-12.
- (142) Yen CY, Liu SY, Chen CH, Tseng HF, Chuang LY, Yang CH, et al. Combinational polymorphisms of four DNA repair genes XRCC1, XRCC2, XRCC3, and XRCC4 and their association with oral cancer in Taiwan. *J.Oral Pathol.Med.* 2008 May;37(5):271-7.
- (143) Cedeño F, Tonino P. Angiogénesis en lesiones premalignas y malignas de la mucosa bucal. *Acta Odontol.Venez.* 2005 Mar;43(2):108-12.
- (144) Macluskey M, Baillie R, Morrow H, Schor SL, Schor AM. Extraction of RNA from archival tissues and measurement of thrombospondin-1 mRNA in normal, dysplastic, and malignant oral tissues. *Br.J.Oral Maxillofac.Surg.* 2006 Apr;44(2):116-23.
- (145) Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat.Med.* 2003 Jun;9(6):669-76.
- (146) Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr.Rev.* 1997 Feb;18(1):4-25.
- (147) Gupta K, Kshirsagar S, Li W, Gui L, Ramakrishnan S, Gupta P, et al. VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Exp.Cell Res.* 1999 Mar;247(2):495-504.
- (148) Sugerman PB, Savage NW. Current concepts in oral cancer. *Aust.Dent.J.* 1999 Sep;44(3):147-56.
- (149) Yamamoto E, Miyakawa A, Kohama G. Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck Surg.* 1984 May-Jun;6(5):938-47.
- (150) Fidler IJ. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.* 1978 Sep;38(9):2651-60.
- (151) Arvelo F, Poupon MF. Aspectos moleculares y celulares de la metástasis cancerosa. *Acta Cient.Venez.* 2001 Jun;52:304-12.
- (152) Germanov E, Berman JN, Guernsey DL. Current and future approaches for the therapeutic targeting of metastasis (review). *Int.J.Mol.Med.* 2006 Dec;18(6):1025-36.
- (153) Rodríguez L, Jurado FR, Reyes JA. La proteólisis en la invasión y metástasis de la célula tumoral. *Rev.Inst.Nal.Cancerol. (Mex)* 2000 Jul;46(1):33-46.

- (154) Neppelberg E, Johannessen AC. DNA content, Cyclooxygenase-2 expression and loss of E-cadherin expression do not predict risk of malignant transformation in oral lichen planus. *Eur.Arch.Otorhinolaryngol.* 2007 Oct;264(10):1223-30.
- (155) Smith ME, Pignatelli M. The molecular histology of neoplasia: the role of the cadherin/catenin complex. *Histopathology* 1997 Aug;31(2):107-111.
- (156) Somoza JM. Análisis de la expresión genética diferencial del carcinoma epidermoide de la cavidad oral mediante el array “*atlas glass human 3.8 i microarray*”. Estudio exploratorio [tesis doctoral]. Santiago de Compostela: Servicio de Publicacións e Intercambio Científico. Universidad de Santiago de Compostela; 2003.
- (157) Loning T, Henke RP, Reichart P, Becker J. In situ hybridization to detect Epstein-Barr virus DNA in oral tissues of HIV-infected patients. *Virchows Arch.A Pathol.Anat.Histopathol.* 1987 Aug;412(2):127-33.
- (158) De Souza YG, Greenspan D, Felton JR, Hartzog GA, Hammer M, Greenspan JS. Localization of Epstein-Barr virus DNA in the epithelial cells of oral hairy leukoplakia by in situ hybridization of tissue sections. *N.Engl.J.Med.* 1989 Jun;320(23):1559-60.
- (159) González MA, González S, Ruíz I, Rodríguez A, Bagán JV, Ceballos A. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA using in situ hybridization in oral lichen planus. *Med.Oral* 1999 Mar;4(2):391-7.
- (160) Saito T, Nakajima T, Mogi K. Immunohistochemical analysis of cell cycle-associated proteins p16, pRb, p53, p27 and Ki-67 in oral cancer and precancer with special reference to verrucous carcinomas. *J.Oral Pathol.Med.* 1999 May;28(5):226-32.
- (161) Kellokoski JK, Syrjanen SM, Chang F, Yliskoski M, Syrjanen KJ. Southern blot hybridization and PCR in detection of oral human papillomavirus (HPV) infections in women with genital HPV infections. *J.Oral Pathol.Med.* 1992 Nov;21(10):459-64.
- (162) Dawkins HJ, Robbins PD, Sarna M, Carrello S, Harvey JM, Sterrett GF. c-erbB-2 amplification and overexpression in breast cancer: evaluation and comparison of Southern blot, slot blot, ELISA and immunohistochemistry. *Pathol.* 1993 Apr;25(2):124-32.
- (163) Lin SL. Single-cell mRNA library analysis by Northern blot hybridization. *Methods Mol.Biol.* 2003 Apr;221:169-78.
- (164) Taniguchi M, Miura K, Iwao H, Yamanaka S. Quantitative assessment of DNA microarrays--comparison with Northern blot analyses. *Genomics* 2001 Jan;71(1):34-9.
- (165) Oste C. Polymerase chain reaction. *BioTechniques* 1988 Feb;6(2):162-7.

- (166) Markham AF. The polymerase chain reaction: a tool for molecular medicine. *BMJ* 1993 Feb;306(6875):441-6.
- (167) Reis PP, Rogatto SR, Kowalski LP, Nishimoto IN, Montovani JC, Corpus G, et al. Quantitative real-time PCR identifies a critical region of deletion on 22q13 related to prognosis in oral cancer. *Oncogene* 2002 Sep;21(42):6480-7.
- (168) Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat.Genet.* 1999 Jan;21(1 Suppl):10-4.
- (169) Ojaniemi H, Evengard B, Lee DR, Unger ER, Vernon SD. Impact of RNA extraction from limited samples on microarray results. *BioTechniques* 2003 Nov;35(5):968-73.
- (170) Hu N, Luxia Q, Ying H, Jian ZS, Chaoyu W, Carol G, Hong QW et al. Cuantitativa en tiempo real RT-PCR validación de la expresión diferencial de mRNA de *SPARC*, *FADD*, *Fascin*, *COL7A1*, *CK4*, *TGM3*, *ECM1*, *PPL* *EVPL* en el carcinoma de células escamosas de esófago. *BMC Cancer* 2006 Nov;6:33.
- (171) Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, Unger ER. Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J.Mol.Diagn.* 2001 Feb;3(1):26-31.
- (172) Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y)* 1993 Sep;11(9):1026-30.
- (173) Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* 1997 Jan;22(1):130-1, 134-8.
- (174) Alevizos I, Mahadevappa M, Zhang X, Ohyama H, Kohno Y, Posner M, et al. Oral cancer in vivo gene expression profiling assisted by laser capture microdissection and microarray analysis. *Oncogene* 2001 Sep;20(43):6196-204.
- (175) Al Moustafa AE, Alaoui MA, Batist G, Hernández M, Serruya C, Alpert L, et al. Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene* 2002 Apr;21(17):2634-40.
- (176) Francioso F, Carinci F, Tosi L, Scapoli L, Pezzetti F, Passerella E, et al. Identification of differentially expressed genes in human salivary gland tumors by DNA microarrays. *Mol.Cancer.Ther.* 2002 May;1(7):533-38.

- (177) Hartmann KA, Modlich O, Prisack HB, Gerlach B, Bojar H. Gene expression profiling of advanced head and neck squamous cell carcinomas and two squamous cell carcinoma cell lines under radio/chemotherapy using cDNA arrays. *Radiother.Oncol.* 2002 Jun;63(3):309-20.
- (178) Kuo WP, Hasina R, Ohno-Machado L, Lingen MW. Classification and identification of genes associated with oral cancer based on gene expression profiles. A preliminary study. *N.Y.State Dent.J.* 2003 Feb;69(2):23-6.
- (179) Zhang X, Liu Y, Gilcrease MZ, Yuan XH, Clayman GL, Adler-Storthz K, et al. A lymph node metastatic mouse model reveals alterations of metastasis-related gene expression in metastatic human oral carcinoma sublines selected from a poorly metastatic parental cell line. *Cancer* 2002 Oct;95(8):1663-72.
- (180) Méndez E, Cheng C, Farwell DG, Ricks S, Agoff SN, Futran ND, et al. Transcriptional expression profiles of oral squamous cell carcinomas. *Cancer* 2002 Oct;95(7):1482-94.
- (181) Ibrahim SO, Aarsaether N, Holsve MK, Kross KW, Heimdal JH, Aarstad JH, et al. Gene expression profile in oral squamous cell carcinomas and matching normal oral mucosal tissues from black Africans and white Caucasians: the case of the Sudan vs. Norway. *Oral Oncol.* 2003 Jan;39(1):37-48.
- (182) Hwang D, Alevizos I, Schmitt WA, Misra J, Ohyama H, Todd R, et al. Genomic dissection for characterization of cancerous oral epithelium tissues using transcription profiling. *Oral Oncol.* 2003 Apr;39(3):259-68.
- (183) Nagata M, Fujita H, Ida H, Hoshina H, Inoue T, Seki Y, et al. Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. *Int.J.Cancer* 2003 Sep;106(5):683-9.
- (184) Brinkman BM, Wong DT. Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Curr.Opin.Oncol.* 2006 May;18(3):228-33.
- (185) Ziober AF, Patel KR, Alawi F, Gimotty P, Weber RS, Feldman MM, et al. Identification of a gene signature for rapid screening of oral squamous cell carcinoma. *Clin.Cancer Res.* 2006 Oct;12(20 Pt 1):5960-71.
- (186) Nguyen ST, Hasegawa S, Tsuda H, Tomioka H, Ushijima M, Noda M, et al. Identification of a predictive gene expression signature of cervical lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Cancer.Sci.* 2007 May;98(5):740-6.

- (187) Martínez I, Wang J, Hobson KF, Ferris RL, Khan SA. Identification of differentially expressed genes in HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Eur.J.Cancer* 2007 Jan;43(2):415-32.
- (188) Chang JT, Wang HM, Chang KW, Chen WH, Wen MC, Hsu YM, et al. Identification of differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma (OSCC): overexpression of NPM, CDK1 and NDRG1 and underexpression of CHES1. *Int.J.Cancer* 2005 May;114(6):942-9.
- (189) Arora S, Matta A, Shukla NK, Deo SV, Ralhan R. Identification of differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma. *Mol.Carcinog.* 2005 Feb;42(2):97-108.
- (190) Jeon GA, Lee JS, Patel V, Gutkind JS, Thorgeirsson SS, Kim EC, et al. Global gene expression profiles of human head and neck squamous carcinoma cell lines. *Int.J.Cancer* 2004 Nov;112(2):249-58.
- (191) Ginos MA, Page GP, Michalowicz BS, Patel KJ, Volker SE, Pambuccian SE, et al. Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* 2004 Jan;64(1):55-63.
- (192) González HE, Gujrati M, Frederick M, Henderson Y, Arumugam J, Spring PW, et al. Identification of 9 genes differentially expressed in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch.Otolaryngol.Head.Neck.Surg.* 2003 Jul;129(7):754-9.
- (193) Leethanakul C, Knezevic V, Patel V, Amornphimoltham P, Gillespie J, Shillitoe EJ, et al. Gene discovery in oral squamous cell carcinoma through the Head and Neck Cancer Genome Anatomy Project: confirmation by microarray analysis. *Oral Oncol.* 2003 Apr;39(3):248-58.
- (194) Steinau M, Lee DR, Rajeevan MS, Vernon SD, Ruffin MT, Unger ER. Gene expression profile of cervical tissue compared to exfoliated cells: impact on biomarker discovery. *BMC Genomics* 2005 May;6(1):64.
- (195) Stephens HA, Vaughan RW, Collins R, Kondeatis E, Theron J, Payne A. Towards a molecular phototyping system for allelic variants of MICA, encoded by polymorphisms in exons 2, 3 and 4 of MHC class I chain-related genes. *Tissue Antigens* 1999 Feb;53(2):167-74.
- (196) Costa AL, de Araujo NS, Pinto DS, de Araujo VC. PCNA/AgNOR and Ki-67/AgNOR double staining in oral squamous cell carcinoma. *J.Oral Pathol.Med.* 1999 Nov;28(10):438-41.

- (197) Zhou X, Zhang Z, Yang X, Chen W, Zhang P. Inhibition of cyclin D1 expression by cyclin D1 shRNAs in human oral squamous cell carcinoma cells is associated with increased cisplatin chemosensitivity. *Int.J.Cancer* 2009 Jan;124(2):483-489.
- (198) Marsit CJ, Black CC, Posner MR, Kelsey KT. A genotype-phenotype examination of cyclin D1 on risk and outcome of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin.Cancer Res.* 2008 Apr;14(8):2371-7.
- (199) Moles MAG, Montoya JAG, Ávila IR. Bases moleculares de la cancerización de cavidad oral. *Av.Odontoestomatol.* 2008 Mar;24(1):55-60.
- (200) Sathyan KM, Nalinakumari KR, Abraham T, Kannan S. CCND1 polymorphisms (A870G and C1722G) modulate its protein expression and survival in oral carcinoma. *Oral Oncol.* 2008 Jul;44(7):689-97.
- (201) Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, Iwamoto T, Hirata K, Mizuno A. Clinicopathologic significance of EpCAM expression in squamous cell carcinoma of the tongue and its possibility as a potential target for tongue cancer gene therapy. *Oral Oncol.* 2007 Oct;43(9):869-77.
- (202) Schwarz S, Bier J, Driemel O, Reichert TE, Hauke S, Hartmann A, et al. Losses of 3p14 and 9p21 as shown by fluorescence in situ hybridization are early events in tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma and already occur in simple keratosis. *Cytometry A.* 2008 Apr;73(4):305-11.
- (203) Ohta S, Uemura H, Matsui Y, Ishiguro H, Fujinami K, Kondo K, et al. Alterations of p16 and p14ARF genes and their 9p21 locus in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 2009 Jan;107(1):81-91.
- (204) Teresa DB, Neves KA, Neto CB, Fregonezi PA, de Oliveira MR, Zuanon JA, et al. Computer-assisted analysis of cell proliferation markers in oral lesions. *Acta Histochem.* 2007 Jul;109(5):377-87.
- (205) Schwartz JL, Gu X, Kittles RA, Baptiste A, Shklar G. Experimental oral carcinoma of the tongue and buccal mucosa: possible biologic markers linked to cancers at two anatomic sites. *Oral Oncol.* 2000 Mar;36(2):225-35.
- (206) Fong D, Spizzo G, Gostner JM, Gastl G, Moser P, Krammel C, et al. TROP2: a novel prognostic marker in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Mod.Pathol.* 2008 Feb;21(2):186-91.
- (207) Mullis TC, Tang X, Chong KT. Expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in head and neck squamous cell carcinoma. *J.Clin.Pathol.* 2008 May;61(5):606-10.

- (208) Kumar SV, Hurteau GJ, Spivack SD. Validity of messenger RNA expression analyses of human saliva. *Clin.Cancer Res.* 2006 Sep;12(17):5033-9.
- (209) Zhong LP, Zhu HG, Zhang CP, Chen WT, Zhang ZY. Detection of serum Cyfra 21-1 in patients with primary oral squamous cell carcinoma. *Int.J.Oral Maxillofac.Surg.* 2007 Mar;36(3):230-4.
- (210) Zhong LP, Zhang CP, Zheng JW, Li J, Chen WT, Zhang ZY. Increased Cyfra 21-1 concentration in saliva from primary oral squamous cell carcinoma patients. *Arch.Oral Biol.* 2007 Nov;52(11):1079-87.
- (211) Bahar G, Feinmesser R, Shpitzer T, Popovtzer A, Nagler RM. Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. *Cancer* 2007 Jan;109(1):54-9.
- (212) Landesberg R, Woo V, Huang L, Cozin M, Lu Y, Bailey C, et al. The expression of the receptor for glycation endproducts (RAGE) in oral squamous cell carcinomas. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 2008 May;105(5):617-24.
- (213) Imai T, Toyota M, Suzuki H, Akino K, Ogi K, Sogabe Y, et al. Epigenetic inactivation of RASSF2 in oral squamous cell carcinoma. *Cancer.Sci.* 2008 May;99(5):958-66.
- (214) Hullmann M, Reichert TE, Dahse R, von Eggeling F, Pistner H, Kosmehl H, et al. Oral cytology: historical development, current status, and perspectives. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2007 Jan;11(1):1-9.
- (215) Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J.Can.Dent.Assoc.* 2002 Nov;68(10):617-21.
- (216) Langlois CC, Devildos LR, Oliveira GL, Aver-Araújo LM. Diagnóstico histopatológico. Manual de aulas práticas. 3ª ed. Pelotas: Faculdade de Odontologia: UFPel; 1993.
- (217) Moralis A, Kunkel M, Reichert TE, Kosmehl H, Driemel O. Identification of a recurrent oral squamous cell carcinoma by brush cytology. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2007 Dec;11(6):355-8.
- (218) Papanicolaou GN, Traut HF. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. 1941. *Arch.Pathol.Lab.Med.* 1997 Mar;121(3):211-24.
- (219) Sandler HC. Veterans Administration cooperative study of oral exfoliative cytology. *Acta Cytol.* 1963 May-Jun;7:180-2.
- (220) Chandler JR. The nonvalue of oral cytology. *Arch.Otolaryngol.* 1966 Nov;84(5):527-33.

- (221) Ogden GR, Cowpe JG, Wight AJ. Oral exfoliative cytology: review of methods of assessment. *J.Oral Pathol.Med.* 1997 May;26(5):201-5.
- (222) Sugerman PB, Savage NW. Exfoliative cytology in clinical oral pathology. *Aust.Dent.J.* 1996 Apr;41(2):71-4.
- (223) Ogden GR, Cowpe JG, Green M. Cytobrush and wooden spatula for oral exfoliative cytology. A comparison. *Acta Cytol.* 1992 Sep-Oct;36(5):706-10.
- (224) Jones AC, Pink FE, Sandow PL, Stewart CM, Migliorati CA, Baughman RA. The Cytobrush Plus cell collector in oral cytology. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.* 1994 Jan;77(1):95-9.
- (225) Tate KM, Strickland JL. A randomized controlled trial to evaluate the use of the endocervical brush after endocervical curettage. *Obstet.Gynecol.* 1997 Nov;90(5):715-7.
- (226) Boardman LA, Meinz H, Steinhoff MM, Heber WW, Blume J. A randomized trial of the sleeved cytobrush and the endocervical curette. *Obstet.Gynecol.* 2003 Mar;101(3):426-30.
- (227) Nichols ML, Quinn FB.Jr, Schnadig VJ, Zaharopoulos P, Hokanson JA, Des Jardins L, et al. Interobserver variability in the interpretation of brush cytologic studies from head and neck lesions. *Arch.Otolaryngol.Head.Neck.Surg.* 1991 Dec;117(12):1350-5.
- (228) Hayama FH, Motta AC, Silva Ade P, Migliari DA. Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal* 2005 Mar-Apr;10(2):115-22.
- (229) Drinnan AJ. Screening for oral cancer and precancer--a valuable new technique. *Gen.Dent.* 2000 Nov-Dec;48(6):656-660.
- (230) Sciubba JJ. Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. Computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. U.S. Collaborative OralCDx Study Group. *J.Am.Dent.Assoc.* 1999 Oct;130(10):1445-57.
- (231) Rick GM. Oral brush biopsy: the problem of false positives. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 2003 Sep;96(3):252.
- (232) Fist S. The oral brush biopsy: separating fact from fiction. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 2003 Dec;96(6):654-5.
- (233) Remmerbach TW, Weidenbach H, Pomjanski N, Knops K, Mathes S, Hemprich A, et al. Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. *Anal.Cell.Pathol.* 2001 Jul;22(4):211-21.

- (234) Potter TJ, Summerlin DJ, Campbell JH. Oral malignancies associated with negative transepithelial brush biopsy. *J.Oral Maxillofac.Surg.* 2003 Jun;61(6):674-7.
- (235) Ahmed HG, Idris AM, Ibrahim SO. Study of oral epithelial atypia among Sudanese tobacco users by exfoliative cytology. *Anticancer Res.* 2003 Mar-Apr;23(2C):1943-9.
- (236) Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J.Oral Pathol.Med.* 2008 Mar;37(3):127-33.
- (237) Walling DM, Flaitz CM, Adler-Storthz K, Nichols CM. A non-invasive technique for studying oral epithelial Epstein-Barr virus infection and disease. *Oral Oncol.* 2003 Jul;39(5):436-44.
- (238) Cheng B, Rhodus NL, Williams B, Griffin RJ. Detection of apoptotic cells in whole saliva of patients with oral premalignant and malignant lesions: a preliminary study. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 2004 Apr;97(4):465-70.
- (239) Orellana AI, Espinoza IL, Franco ME, Lobos-James N, Ortega AV. Evaluation of keratinization and AgNORs count in exfoliative cytology of normal oral mucosa from smokers and non-smokers. *Med.Oral* 2004 May-Jul;9(3):197-203.
- (240) Remmerbach TW, Weidenbach H, Muller C, Hemprich A, Pomjanski N, Buckstegge B, et al. Diagnostic value of nucleolar organizer regions (AgNORs) in brush biopsies of suspicious lesions of the oral cavity. *Anal.Cell.Pathol.* 2003 Aug;25(3):139-46.
- (241) Kobayashi TK, Ueda M, Nishino T, Terasaki S, Kameyama T. Brush cytology of herpes simplex virus infection in oral mucosa: use of the ThinPrep processor. *Diagn.Cytopathol.* 1998 Jan;18(1):71-5.
- (242) Linder J, Zahniser D. The ThinPrep Pap test. A review of clinical studies. *Acta Cytol.* 1997 Jan-Feb;41(1):30-8.
- (243) Nasuti JF, Tam D, Gupta PK. Diagnostic value of liquid-based (Thinprep) preparations in nongynecologic cases. *Diagn.Cytopathol.* 2001 Feb;24(2):137-41.
- (244) Sprenger E, Schwarzmann P, Kirkpatrick M, Fox W, Heinzerling RH, Geyer JW, et al. The false negative rate in cervical cytology. Comparison of monolayers to conventional smears. *Acta Cytol.* 1996 Jan-Feb;40(1):81-9.
- (245) Bishop JW, Bigner SH, Colgan TJ, Husain M, Howell LP, McIntosh KM, et al. Multicenter masked evaluation of AutoCyte PREP thin layers with matched

conventional smears. Including initial biopsy results. *Acta Cytol.* 1998 Jan-Feb;42(1):189-97.

(246) Mollaoglu N, Wilson MJ, Cowpe JG. Extraction of DNA from oral cytological samples by scraping and smear method suitable for restriction site mutation analysis: a pilot study. *Diagn.Cytopathol.* 2001 Aug;25(2):83-5.

(247) Navone R, Pentenero M, Rostan I, Burlo P, Marsico A, Broccoletti R, et al. Oral potentially malignant lesions: first-level micro-histological diagnosis from tissue fragments sampled in liquid-based diagnostic cytology. *J.Oral Pathol.Med.* 2008 Jul;37(6):358-63.

(248) Brunotto M, Zárate AM, Cismondi A, del Carmen Fernández M, de Halac RIN. Valuation of exfoliative cytology as prediction factor in oral mucosa lesions. *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal* 2005 Mar;Suppl 2:E92-102.

(249) Diniz M, García A, Crespo A, Martins JL, Gándara JM. Applications of exfoliative cytology in the diagnosis of oral cancer. *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal* (Ed.impresa) 2004 Apr;9:355-61.

(250) Cowpe JG, Longmore RB, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal oral squames: an age, site and sex-related survey. *J.R.Soc.Med.* 1985 Dec;78(12):995-1004.

(251) Cowpe JG, Longmore RB, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of abnormal oral mucosal smears. *J.R.Soc.Med.* 1988 Sep;81(9):509-13.

(252) Cowpe JG, Ogden GR, Green MW. Comparison of planimetry and image analysis for the discrimination between normal and abnormal cells in cytological smears of suspicious lesions of the oral cavity. *Cytopathol.* 1993 Jan;4(1):27-35.

(253) Ramaesh T, Mendis BR, Ratnatunga N, Thattil RO. Cytomorphometric analysis of squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *J.Oral Pathol.Med.* 1998 Feb;27(2):83-6.

(254) Diniz MD, García AG, Abelleira AC, Carneiro JLM, Gándara JMG. Aplicaciones de la citología exfoliativa en el diagnóstico del cáncer oral. *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal* 2004 Feb;9(4):355-61.

(255) Saiz R, Corchero G, García Perea B, González T, Sánchez S. Carcinoma oral de células escamosas. Parámetros citométricos de interés pronóstico. *Med.Oral Patol. Oral Cir.Bucal* 2005 Apr;10(5):462-7.

- (256) Maraki D, Yalcinkaya S, Pomjanski N, Megahed M, Boecking A, Becker J. Cytologic and DNA-cytometric examination of oral lesions in lichen planus. *J.Oral Pathol.Med.* 2006 Apr;35(4):227-32.
- (257) Pektas ZO, Keskin A, Gunhan O, Karslioglu Y. Evaluation of nuclear morphometry and DNA ploidy status for detection of malignant and premalignant oral lesions: quantitative cytologic assessment and review of methods for cytomorphometric measurements. *J.Oral Maxillofac.Surg.* 2006 Apr;64(4):628-35.
- (258) García del Moral R, Quesada MJ, Ruíz I. Histoquímica de proteínas, aminas biógenas y ácidos nucleicos. En: García del Moral R, editor. *Laboratorio de anatomía patológica*. 1ª ed. Madrid: McGraw-Hill– Interamericana de España; 1993. p. 245-263.
- (259) Tucker JH, Cowpe JG, Ogden GR. Nuclear DNA content and morphometric characteristics of normal, premalignant and malignant oral smears. *Anal.Cell.Pathol.* 1994 Feb;6(2):117-28.
- (260) Franzen G, Klintenberg C, Olofsson J, Risberg B. DNA measurement--an objective predictor of response to irradiation? A review of 24 squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Br.J.Cancer* 1986 May;53(5):643-51.
- (261) Tytor M, Franzen G, Olofsson J, Brunk U, Nordenskjold B. DNA content, malignancy grading and prognosis in T1 and T2 oral cavity carcinomas. *Br.J.Cancer* 1987 Nov;56(5):647-52.
- (262) Sudbo J, Kildal W, Risberg B, Koppang HS, Danielsen HE, Reith A. DNA content as a prognostic marker in patients with oral leukoplakia. *N.Engl.J.Med.* 2001 Apr;344(17):1270-8.
- (263) Doseva D, Christov K, Kristeva K. DNA content in reactive hyperplasia, precancerosis, and carcinomas of the oral cavity. A cytophotometric study. *Acta Histochem.* 1984 May;75(2):113-9.
- (264) Remmerbach TW, Weidenbach H, Hemprich A, Bocking A. Earliest detection of oral cancer using non-invasive brush biopsy including DNA-image-cytometry: report on four cases. *Anal.Cell.Pathol.* 2003 Jun;25(4):159-66.
- (265) Thirthagiri E, Robinson CM, Huntley S, Davies M, Yap LF, Prime SS, et al. Spindle assembly checkpoint and centrosome abnormalities in oral cancer. *Cancer Lett.* 2007 Dec;258(2):276-285.
- (266) Schimming R, Hlawitschka M, Haroske G, Eckelt U. Prognostic relevance of DNA image cytometry in oral cavity carcinomas. *Anal.Quant.Cytol.Histol.* 1998 Feb;20(1):43-51.

- (267) Lane EB, Alexander CM. Use of keratin antibodies in tumor diagnosis. *Semin.Cancer Biol.* 1990 Jun;1(3):165-79.
- (268) Ogden GR, Chisholm DM, Adi M, Lane EB. Cytokeratin expression in oral cancer and its relationship to tumor differentiation. *J.Oral Pathol.Med.* 1993 Feb;22(2):82-6.
- (269) Ogden GR, McQueen S, Chisholm DM, Lane EB. Keratin profiles of normal and malignant oral mucosa using exfoliative cytology. *J.Clin.Pathol.* 1993 Apr;46(4):352-6.
- (270) Ogden GR, Cowpe JG, Chisholm DM, Lane EB. DNA and keratin analysis of oral exfoliative cytology in the detection of oral cancer. *Eur.J.Cancer.B.Oral Oncol.* 1994 Nov;30B(6):405-8.
- (271) Bongers V, Snow GB, de Vries N, Braakhuis BJ. Potential early markers of carcinogenesis in the mucosa of the head and neck using exfoliative cytology. *J.Pathol.* 1996 Mar;178(3):284-289.
- (272) Kujan O, Desai M, Sargent A, Bailey A, Turner A, Sloan P. Potential applications of oral brush cytology with liquid-based technology: results from a cohort of normal oral mucosa. *Oral Oncol.* 2006 Sep;42(8):810-818.
- (273) Ogden GR, Kiddie RA, Lunny DP, Lane DP. Assessment of p53 protein expression in normal, benign, and malignant oral mucosa. *J.Pathol.* 1992 Apr;166(4):389-94.
- (274) Ogden GR, Leigh I, Chisholm DM, Cowpe JG, Lane EB. Exfoliative cytology of normal oral mucosa. Assessing the basal cell keratin phenotype. *Acta Cytol.* 1996 Sep-Oct;40(5):933-6.
- (275) Szelachowska J, Dziegiel P, Jelen-Krzyszewska J, Jelen M, Tarkowski R, Wlodarska I, et al. Prognostic significance of nuclear and cytoplasmic expression of metallothioneins as related to proliferative activity in squamous cell carcinomas of oral cavity. *Histol.Histopathol.* 2008 Jul;23(7):843-51.
- (276) Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, Kleinsasser N, Staudenmaier R, Muller-Richter U, et al. Performance of conventional oral brush biopsies. *HNO* 2008 Feb;56(2):205-10.
- (277) Spafford MF, Koch WM, Reed AL, Califano JA, Xu LH, Eisenberger CF, et al. Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells by microsatellite analysis. *Clin.Cancer Res.* 2001 Mar;7(3):607-12.
- (278) Ogden GR, Cowpe JG, Green MW. Detection of field change in oral cancer using oral exfoliative cytologic study. *Cancer* 1991 Oct;68(7):1611-5.

- (279) Boyle JO, Mao L, Brennan JA, Koch WM, Eisele DW, Saunders JR, et al. Gene mutations in saliva as molecular markers for head and neck squamous cell carcinomas. *Am.J.Surg.* 1994 Nov;168(5):429-32.
- (280) Scheifele C, Schlechte H, Bethke G, Reichart PA. Detection of TP53-mutations in brush biopsies from oral leukoplakias. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2002 Nov;6(6):410-4.
- (281) Liao PH, Chang YC, Huang MF, Tai KW, Chou MY. Mutation of p53 gene codon 63 in saliva as a molecular marker for oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2000 May;36(3):272-6.
- (282) Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG, Wu L, Califano J, Westra W, et al. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res.* 2001 Feb;61(3):939-42.
- (283) El-Naggar AK, Mao L, Staerckel G, Coombes MM, Tucker SL, Luna MA, et al. Genetic heterogeneity in saliva from patients with oral squamous carcinomas: implications in molecular diagnosis and screening. *J.Mol.Diagn.* 2001 Nov;3(4):164-70.
- (284) López M, Aguirre JM, Cuevas N, Anzola M, Videgain J, Aguirregaviria J, et al. Gene promoter hypermethylation in oral rinses of leukoplakia patients--a diagnostic and/or prognostic tool? *Eur.J.Cancer* 2003 Nov;39(16):2306-9.
- (285) Huang MF, Chang YC, Liao PS, Huang TH, Tsay CH, Chou MY. Loss of heterozygosity of p53 gene of oral cancer detected by exfoliative cytology. *Oral Oncol.* 1999 May;35(3):296-301.
- (286) Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv.Cancer Res.* 1998 Jul;72:141-96.
- (287) el-Naggar AK, Hurr K, Batsakis JG, Luna MA, Goepfert H, Huff V. Sequential loss of heterozygosity at microsatellite motifs in preinvasive and invasive head and neck squamous carcinoma. *Cancer Res.* 1995 Jun;55(12):2656-59.
- (288) Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* 1996 Jun;56(11):2488-92.
- (289) Mao L, Lee DJ, Tockman MS, Erozan YS, Askin F, Sidransky D. Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1994 Oct;91(21):9871-5.

- (290) Rosin MP, Epstein JB, Berean K, Durham S, Hay J, Cheng X, et al. The use of exfoliative cell samples to map clonal genetic alterations in the oral epithelium of high-risk patients. *Cancer Res.* 1997 Dec;57(23):5258-60.
- (291) Okami K, Imate Y, Hashimoto Y, Kamada T, Takahashi M. Molecular detection of cancer cells in saliva from oral and pharyngeal cancer patients. *Tokai J.Exp.Clin.Med.* 2002 Sep;27(3):85-9.
- (292) Nunes DN, Kowalski LP, Simpson AJ. Detection of oral and oropharyngeal cancer by microsatellite analysis in mouth washes and lesion brushings. *Oral Oncol.* 2000 Nov;36(6):525-8.
- (293) Driemel O, Kosmehl H, Rosenhahn J, Berndt A, Reichert TE, Zardi L, et al. Expression analysis of extracellular matrix components in brush biopsies of oral lesions. *Anticancer Res.* 2007 May-Jun;27(3B):1565-70.
- (294) Nelson H, Nelson N. The progenitor of ATP synthases was closely related to the current vacuolar H⁺-ATPase. *FEBS Lett.* 1989 Apr;247(1):147-53.
- (295) Domínguez L, Tuena M. ATP sintasa: un complejo proteico con gran versatilidad estructural y funcional. *Rev.Espec.Ciencias Quím.Biol.* 2005 Sep;8(1):18-27.
- (296) Marshansky V, Futai M. The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2008 Aug;20(4):415-26.
- (297) Zhang J, Myers M, Forgac M. Characterization of the V0 domain of the coated vesicle (H⁺)-ATPase. *J.Biol.Chem.* 1992 May;267(14):9773-8.
- (298) Nelson N. Evolution of organellar proton-ATPases. *Biochim.Biophys.Acta* 1992 May;1100(2):109-24.
- (299) Kane PM. Introduction: V-ATPases 1992-1998. *J.Bioenerg.Biomembr.* 1999 Feb;31(1):3-5.
- (300) Saroussi S, Nelson N. Vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase-an enzyme for all seasons. *Pflugers Arch.Eur.J.Physiol.* 2009 Aug;457:581-7.
- (301) Stevens TH, Forgac M. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 1997 Apr;13:779-808.
- (302) Forgac M. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *FEBS Letters* 1998 Apr;440(3):258-63.
- (303) Nishi T, Forgac M. The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2002 Feb;3(2):94-103.
- (304) Kawasaki-Nishi S, Nishi T, Forgac M. Proton translocation driven by ATP hydrolysis in V-ATPases. *FEBS Lett.* 2003 Jun;545(1):76-85.

- (305) Finbow ME, Harrison MA. The vacuolar H⁺-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochem.J.* 1997 Jun;324(Pt 3):697-712.
- (306) Moriyama Y, Nelson N. H⁺-translocating ATPase in Golgi apparatus. Characterization as vacuolar H⁺-ATPase and its subunit structures. *J.Biol.Chem.* 1989 Nov;264(31):18445-50.
- (307) Schoonderwoert VTG, Holthuis JCM, Tanaka S, Tooze SA, Martens GJM. Inhibition of the vacuolar H⁺-ATPase perturbs the transport, sorting, processing and release of regulated secretory proteins. *Europ.J.Biochem.* 2000 Sep;267(17):5646-54.
- (308) Smith AN, Jouret F, Bord S, Borthwick KJ, Al-Lamki RS, Wagner CA, et al. Vacuolar H⁺-ATPase d2 subunit: molecular characterization, developmental regulation, and localization to specialized proton pumps in kidney and bone. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2005 May;16(5):1245-56.
- (309) van Hille B, Vanek M, Richener H, Green JR, Bilbe G. Cloning and tissue distribution of subunits C, D, and E of the human vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1993 Nov;197(1):15-21.
- (310) Nanda A, Brumell JH, Nordstrom T, Kjeldsen L, Sengelov H, Borregaard N, et al. Activation of Proton Pumping in Human Neutrophils Occurs by Exocytosis of Vesicles Bearing Vacuolar-type H⁺-ATPases. *J.Biol.Chem.* 1996 Jul;271(27):15963-70.
- (311) Martínez-Zaguilán R, Lynch RM, Martínez GM, Gillies RJ. Vacuolar-type H⁽⁺⁾-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *Am J Physiol.Cell Physiol.* 1993 Oct;265(4):C1015-29.
- (312) Sun-Wada GH, Wada Y, Futai M. Vacuolar H⁺ pumping ATPases in luminal acidic organelles and extracellular compartments: common rotational mechanism and diverse physiological roles. *J.Bioenerg.Biomembr.* 2003 Aug;35(4):347-58.
- (313) Sun-Wada G, Wada Y, Futai M. Diverse and essential roles of mammalian vacuolar-type proton pump ATPase: toward the physiological understanding of inside acidic compartments. *Bioch.Bioph.Acta-Bioenerg.* 2004 Jul;1658(1-2):106-14.
- (314) Kurashima K, Numata M, Yachie A, Sai Y, Ishizaka N, Fujimura M, et al. The role of vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase in the control of intragranular pH and exocytosis in eosinophils. *Lab.Invest.* 1996 Nov;75(5):689-98.
- (315) Nelson N, Harvey WR. Vacuolar and Plasma Membrane Proton-Adenosinetriphosphatases. *Physiol.Rev.* 1999 Apr;79(2):361-85.
- (316) Baars TL, Petri S, Peters C, Mayer A. Role of the V-ATPase in Regulation of the Vacuolar Fission Fusion Equilibrium. *Mol.Biol.Cell* 2007 Oct;18(10):3873-82.

- (317) Muller O, Neumann H, Bayer MJ, Mayer A. Role of the Vtc proteins in V-ATPase stability and membrane trafficking. *J.Cell Sci.* 2003 Mar;116(6):1107-15.
- (318) Wada Y, Sun-Wada GH, Tabata H, Kawamura N. Vacuolar-type proton ATPase as regulator of membrane dynamics in multicellular organisms. *J.Bioenerg.Biomembr.* 2008 Feb;40(1):53-7.
- (319) Guyton A HJ. Metabolismo de los hidratos de carbono y formación del trifosfato de adenosina. In: Guyton A HJ, editor. *Tratado de fisiología médica*. 9ª ed. Madrid: Hill-Interamericana de España; 1996. p. 927-938.
- (320) Nelson N, Perzov N, Cohen A, Hagai K, Padler V, Nelson H. The cellular biology of proton-motive force generation by V-ATPases. *J.Exp.Biol.* 2000 Jan;203(Pt 1):89-95.
- (321) Drory O, Nelson N. The emerging structure of vacuolar ATPases. *Physiol.(Bethesda)* 2006 Oct;21:317-25.
- (322) Wieczorek H, Brown D, Grinstein S, Ehrenfeld J, Harvey WR. Animal plasma membrane energization by proton-motive V-ATPases. *Bioessays* 1999 Aug;21(8):637-48.
- (323) Philippe JM, Dubois JM, Rouzaire-Dubois B, Cartron PF, Vallette F, Morel N. Functional expression of V-ATPases in the plasma membrane of glial cells. *Glia* 2002 Mar;37(4):365-73.
- (324) Harvey WR, Wieczorek H. Animal plasma membrane energization by chemiosmotic H⁺ V-ATPases. *J.Exp.Biol.* 1997 Jan;200(Pt 2):203-16.
- (325) Nakano M, Imamura H, Toei M, Tamakoshi M, Yoshida M, Yokoyama K. ATP hydrolysis and synthesis of a rotary motor V-ATPase from *thermus thermophilus*. *J. Biol.Chem.* 2008 Jul;283(30):20789-96.
- (326) Beyenbach KW, Wieczorek H. The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J.Exp.Biol.* 2006 Feb;209(4):577-89.
- (327) Harvey WR. Physiology of V-ATPases. *J.Exp.Biol.* 1992 Nov;172:1-17.
- (328) Martínez-Muñoz GA, Kane PM. Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *J.Biol.Chem.* 2008 May;283(29):20309-19.
- (329) Smith AN, Lovering RC, Futai M, Takeda J, Brown D, Karet FE. Revised Nomenclature for Mammalian Vacuolar-Type H⁺-ATPase Subunit Genes. *Mol.Cell* 2003 Oct;12:801-3.
- (330) Wilkens S, Zhang Z, Zheng Y. A structural model of the vacuolar ATPase from transmission electron microscopy. *Micron.* 2005 Feb;36(2):109-26.

- (331) Qi J, Wang Y, Forgac M. The vacuolar (H⁺)-ATPase: subunit arrangement and in vivo regulation. *J.Bioenerg.Biomembr.* 2007 Dec;39(5-6):423-6.
- (332) Inoue T, Wang Y, Jefferies K, Qi J, Hinton A, Forgac M. Structure and regulation of the V-ATPases. *J.Bioenerg.Biomembr.* 2005 Dec;37(6):393-8.
- (333) Boyer PD. The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities. *Biochim.Biophys.Acta* 1993 Jan;1140(3):215-50.
- (334) Miura GI, Froelick GJ, Marsh DJ, Stark KL, Palmiter RD. The d Subunit of the Vacuolar ATPase (*Atp6d*) is Essential for Embryonic Development. *Transgenic Res.* 2003 Feb;12(1):131-3
- (335) Torigoe T, Izumi H, Ise T, Murakami T, Uramoto H, Ishiguchi H, et al. Vacuolar H⁺-ATPase: functional mechanisms and potential as a target for cancer chemotherapy. *Anticancer Drugs* 2002 Mar;13(3):237-43.
- (336) Xu T, Vasilyeva E, Forgac M. Subunit interactions in the clathrin-coated vesicle vacuolar (H⁺)-ATPase complex. *J.Biol.Chem.* 1999 Oct;274(41):28909-15.
- (337) Jones RP, Durose LJ, Findlay JB, Harrison MA. Defined sites of interaction between subunits E (Vma4p), C (Vma5p), and G (Vma10p) within the stator structure of the vacuolar H⁺-ATPase. *Biochem.* 2005 Mar;44(10):3933-41.
- (338) Jefferies KC, Forgac M. Subunit H of the Vacuolar (H⁺) ATPase Inhibits ATP Hydrolysis by the Free V1 Domain by Interaction with the Rotary Subunit F. *J.Biol.Chem.* 2008 Feb;283(8):4512-9.
- (339) Peng S, Stone D, Xie X. Reconstitution of recombinant 40-kDa subunit of the clathrin-coated vesicle H⁺-ATPase. *J.Biol.Chem.* 1993 Nov;268(31):23519-23.
- (340) Svergun DI, Konrad S, Huss M, Koch MH, Wiczorek H, Altendorf K, et al. Quaternary structure of V1 and F1 ATPase: significance of structural homologies and diversities. *Biochemistry* 1998 Dec;37(51):17659-63.
- (341) Armbruster A, Svergun DI, Coskun U, Juliano S, Bailer SM, Gruber G. Structural analysis of the stalk subunit Vma5p of the yeast V-ATPase in solution. *FEBS Lett.* 2004 Jul;570(1-3):119-25.
- (342) Zhang Z, Inoue T, Forgac M, Wilkens S. Localization of subunit C (Vma5p) in the yeast vacuolar ATPase by immuno electron microscopy. *FEBS Lett.* 2006 Apr;580(8):2006-10.
- (343) Chaban YL, Juliano S, Boekema EJ, Gruber G. Interaction between subunit C (Vma5p) of the yeast vacuolar ATPase and the stalk of the C-depleted V(1) ATPase from *Manduca sexta* midgut. *Biochim.Biophys.Acta* 2005 Jun;1708(2):196-200.

- (344) Drory O, Frolow F, Nelson N. Crystal structure of yeast V-ATPase subunit C reveals its stator function. *EMBO Rep.* 2004 Dec;5(12):1148-52.
- (345) Puopolo K, Szczekan M, Magner R, Forgac M. The 40-kDa subunit enhances but is not required for activity of the coated vesicle proton pump. *J.Biol.Chem.* 1992 Mar;267(8):5171-6.
- (346) Beltran C, Kopecky J, Pan YC, Nelson H, Nelson N. Cloning and mutational analysis of the gene encoding subunit C of yeast vacuolar H(+)-ATPase. *J.Biol.Chem.* 1992 Jan;267(2):774-9.
- (347) Voss M, Vitavska O, Walz B, Wieczorek H, Baumann O. Stimulus-induced phosphorylation of vacuolar H(+)-ATPase by protein kinase A. *J.Biol.Chem.* 2007 Nov;282(46):33735-42.
- (348) Izumi H, Ise T, Murakami T, Torigoe T, Ishiguchi H, Uramoto H, et al. Structural and functional characterization of two human V-ATPase subunit gene promoters. *Bioch.Bioph.Acta-Gene Struct.Exp.* 2003 Jul;1628(2):97-104.
- (349) Smardon AM, Kane PM. RAVE is essential for the efficient assembly of the C subunit with the vacuolar H(+)-ATPase. *J.Biol.Chem.* 2007 Sep;282(36):26185-26194.
- (350) Keenan Curtis K, Kane PM. Novel Vacuolar H⁺-ATPase Complexes Resulting from Overproduction of Vma5p and Vma13p. *J.Biol.Chem.* 2002 Jan;277(4):2716-24.
- (351) Sun-Wada GH, Yoshimizu T, Imai-Senga Y, Wada Y, Futai M. Diversity of mouse proton-translocating ATPase: presence of multiple isoforms of the C, d and G subunits. *Gene* 2003 Jan;302(1-2):147-53.
- (352) Pietrement C, Sun-Wada GH, Silva ND, McKee M, Marshansky V, Brown D, et al. Distinct expression patterns of different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymis. *Biol.Reprod.* 2006 Jan;74(1):185-94.
- (353) Breton S, Brown D. New insights into the regulation of V-ATPase-dependent proton secretion. *Am.J.Physiol.Renal Physiol.* 2007 Jan;292(1):F1-10.
- (354) Smith AN, Borthwick KJ, Karet FE. Molecular cloning and characterization of novel tissue-specific isoforms of the human vacuolar H(+)-ATPase C, G and d subunits, and their evaluation in autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Gene* 2002 Sep;297(1-2):169-77.
- (355) Cancer Genome Anatomy Project. 2008; Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgap>. Accedida el 10 Junio, 2008.

- (356) Dujardin B, Van den Ende J, Van Gompel A, Unger JP, Van der Stuyft P. Likelihood ratios: a real improvement for clinical decision making? *Eur.J.Epidemiol.* 1994 Feb;10(1):29-36.
- (357) Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests 3: receiver operating characteristic plots. *BMJ* 1994 Jul;309(6948):188.
- (358) Kosicki DM, Riva C, Pajarola GF, Burkhardt A, Gratz KW. OralCDx brush biopsy--a tool for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Schweiz.Monatsschr.Zahnmed.* 2007 Jan;117(3):222-27.
- (359) Remmerbach TW, Hemprich A, Bocking A. Minimally invasive brush-biopsy: innovative method for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Schweiz.Monatsschr.Zahnmed.* 2007 Nov;117(9):926-40.
- (360) Robinson PN, Mickelson AR. Early diagnosis of oral cavity cancers. *Otolaryngol.Clin.North Am.* 2006 Apr;39(2):295-306.
- (361) Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM, et al. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N.Engl.J.Med.* 1995 Feb;332(7):429-35.
- (362) Dooley TP, Reddy SP, Wilborn TW, Davis RL. Biomarkers of human cutaneous squamous cell carcinoma from tissues and cell lines identified by DNA microarrays and qRT-PCR. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2003 Jul;306(4):1026-36.
- (363) Warner GC, Reis PP, Jurisica I, Sultan M, Arora S, Macmillan C, et al. Molecular classification of oral cancer by cDNA microarrays identifies overexpressed genes correlated with nodal metastasis. *Int.J.Cancer* 2004 Jul;110(6):857-68.
- (364) Spivack SD, Hurteau GJ, Jain R, Kumar SV, Aldous KM, Gierthy JF, et al. Gene-Environment Interaction Signatures by Quantitative mRNA Profiling in Exfoliated Buccal Mucosal Cells. *Cancer Res.* 2004 Sep;64(18):6805-13.
- (365) Smith RV, Schlecht NF, Childs G, Prystowsky MB, Belbin TJ. Pilot study of mucosal genetic differences in early smokers and nonsmokers. *Laryng.* 2006 Aug;116(8):1375-79.
- (366) Schwartz JL, Panda S, Beam C, Bach LE, Adami GR. RNA from brush oral cytology to measure squamous cell carcinoma gene expression. *J.Oral Pathol.Med.* 2008 Feb;37(2):70-7.
- (367) Remmerbach TW, Mathes SN, Weidenbach H, Hemprich A, Bocking A. Noninvasive brush biopsy as an innovative tool for early detection of oral carcinomas. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2004 Jul;8(4):229-36.

- (368) Patel K, Rhodus NL, Gaffney P, Ondrey F. Extraction of RNA from oral biopsies in oral leukoplakia. 2004 Hawaii:IADR Congress(82nd):1240-1.
- (369) Ballantyne J. Validity of messenger RNA expression analyses of human saliva. Clin.Cancer Res. 2007 Feb;13(4):1350; author reply 1351.
- (370) Laine ML, Farre MA, Crusius JB, van Winkelhoff AJ, Pena AS. The mouthwash: a non-invasive sampling method to study cytokine gene polymorphisms. J.Periodontol. 2000 Aug;71(8):1315-8.
- (371) Spira A, Beane J, Schembri F, Liu G, Ding C, Gilman S, et al. Noninvasive method for obtaining RNA from buccal mucosa epithelial cells for gene expression profiling. BioTechniques 2004 Mar;36(3):484-7.
- (372) Villaret DB, Wang T, Dillon D, Xu J, Sivam D, Cheever MA, et al. Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. Laryng. 2000 Mar;110(3 Pt 1):374-81.
- (373) Mackenzie J, Ah-See K, Thakker N, Sloan P, Maran AG, Birch J, et al. Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology? Oral Oncol. 2000 Jul;36(4):387-9.
- (374) Sarkaria JN, Harari PM. Oral tongue cancer in young adults less than 40 years of age: rationale for aggressive therapy. Head Neck 1994 Mar-Apr;16(2):107-11.
- (375) McGregor AD, Rennie JS. Intra-oral squamous cell carcinoma in patients under 40 years of age. A report of 13 cases and review of the literature. Br.J.Plast.Surg. 1987 May;40(3):270-3.
- (376) Silverman S Jr, Gorsky M. Epidemiologic and demographic update in oral cancer: California and national data--1973 to 1985. J.Am.Dent.Assoc. 1990 May;120(5):495-9.
- (377) Feng G, Wang DZ, Chen HQ, Hu J, He J. A new method to induce multi-drug resistance to carboplatin in a mouse model of human tongue squamous cell carcinoma. Int.J.Oral Maxillofac.Surg. 2008 Dec;37(12):1141-7.
- (378) Maraki D, Becker J, Boecking A. Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. J.Oral Pathol.Med. 2004 Aug;33(7):398-404.
- (379) Martínez-Zaguilán R, Raghunand N, Lynch RM, Bellamy W, Martínez GM, Rojas B, et al. pH and drug resistance. I. functional expression of plasmalemmal V-type H⁺-ATPase in drug-resistant human breast carcinoma cell lines. Biochem.Pharmacol. 1999 Jan;57(9):1037-46.

- (380) Ginn-Pease ME, Eng C. Increased nuclear phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 is associated with G0-G1 in MCF-7 cells. *Cancer Res.* 2003 Jan;63(2):282-6.
- (381) Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Uramoto H, Yoshida Y, Tanabe M, et al. Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat.Rev.* 2003 Dec;29(6):541-9.
- (382) Gillies RJ, Raghunand N, Karczmar GS, Bhujwala ZM. MRI of the tumor microenvironment. *J.Magn.Reson.Imaging* 2002 Oct;16(4):430-50.
- (383) Prescott DM, Charles HC, Poulson JM, Page RL, Thrall DE, Vujaskovic Z, et al. The relationship between intracellular and extracellular pH in spontaneous canine tumors. *Clin.Cancer Res.* 2000 Jun;6(6):2501-5.
- (384) Raghunand N, Gillies RJ. pH and drug resistance in tumors. *Drug Resist.Updat.* 2000 Feb;3(1):39-47.
- (385) Becelli R, Renzi G, Morello R, Altieri F. Intracellular and extracellular tumor pH measurement in a series of patients with oral cancer. *J.Craniofac.Surg.* 2007 Sep;18(5):1051-4.
- (386) Martínez-Munoz GA, Kane P. Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *J.Biol.Chem.* 2008 Jul;283(29):20309-19.
- (387) Reshkin SJ, Bellizzi A, Caldeira S, Albarani V, Malanchi I, Poignee M, et al. Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J.* 2000 Nov;14(14):2185-97.
- (388) Juel C. Lactate-proton cotransport in skeletal muscle. *Physiol.Rev.* 1997 Apr;77(2):321-58.
- (389) Hagag N, Lacal JC, Graber M, Aaronson S, Viola MV. Microinjection of ras p21 induces a rapid rise in intracellular pH. *Mol.Cell.Biol.* 1987 May;7(5):1984-8.
- (390) Ober SS, Pardee AB. Intracellular pH is increased after transformation of Chinese hamster embryo fibroblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1987 May;84(9):2766-70.
- (391) Reshkin SJ, Bellizzi A, Albarani V, Guerra L, Tommasino M, Paradiso A, et al. Phosphoinositide 3-kinase is involved in the tumor-specific activation of human breast cancer cell Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange, motility, and invasion induced by serum deprivation. *J.Biol.Chem.* 2000 Feb;275(8):5361-9.

- (392) Siczkowski M, Davies JE, Ng LL. Activity and density of the Na⁺/H⁺ antiporter in normal and transformed human lymphocytes and fibroblasts. *Am.J.Physiol.* 1994 Sep;267(3 Pt 1):C745-52.
- (393) Doppler W, Jaggi R, Groner B. Induction of v-mos and activated Ha-ras oncogene expression in quiescent NIH 3T3 cells causes intracellular alkalinisation and cell-cycle progression. *Gene* 1987 Feb;54(1):147-53.
- (394) Pouyssegur J, Franchi A, Pages G. pHi, aerobic glycolysis and vascular endothelial growth factor in tumour growth. *Novartis Found.Symp.* 2001 Dec;240:186-96; discussion 196-8.
- (395) Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996 Aug;86(3):353-64.
- (396) Orive G, Reshkin SJ, Harguindey S, Pedraz JL. Hydrogen ion dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in cancer angiogenesis and antiangiogenesis. *Br.J.Cancer* 2003 Oct;89(8):1395-9.
- (397) Rojas JD, Sennoune SR, Maiti D, Bakunts K, Reuveni M, Sanka SC, et al. Vacuolar-type H⁺-ATPases at the plasma membrane regulate pH and cell migration in microvascular endothelial cells. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 2006 Sep;291(3):1147-57.
- (398) McLean LA, Roscoe J, Jorgensen NK, Gorin FA, Cala PM. Malignant gliomas display altered pH regulation by NHE1 compared with nontransformed astrocytes. *Am.J.Physiol.Cell.Physiol.* 2000 Apr;278(4):C676-88.
- (399) Montcourrier P, Silver I, Farnoud R, Bird I, Rochefort H. Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism. *Clin.Exp.Metastasis* 1997 Jul;15(4):382-92.
- (400) Parkins CS, Stratford MR, Dennis MF, Stubbs M, Chaplin DJ. The relationship between extracellular lactate and tumour pH in a murine tumour model of ischaemia-reperfusion. *Br.J.Cancer* 1997 May;75(3):319-23.
- (401) Glunde K, Guggino SE, Solaiyappan M, Pathak AP, Ichikawa Y, Bhujwalla ZM. Extracellular acidification alters lysosomal trafficking in human breast cancer cells. *Neoplasia* 2003 Nov-Dec;5(6):533-45.
- (402) Condeelis J, Segall JE. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat.Rev.Cancer* 2003 Dec;3(12):921-30.
- (403) Paradiso A, Cardone RA, Bellizzi A, Bagorda A, Guerra L, Tommasino M, et al. The Na⁺-H⁺ exchanger-1 induces cytoskeletal changes involving reciprocal RhoA and

Rac1 signaling, resulting in motility and invasion in MDA-MB-435 cells. *Breast Cancer Res.* 2004 Oct;6(6):R616-28.

(404) Ling V. Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 1997 Jun;40 Suppl:S3-8.

(405) Raghunand N, Mahoney B, van Sluis R, Baggett B, Gillies RJ. Acute metabolic alkalosis enhances response of C3H mouse mammary tumors to the weak base mitoxantrone. *Neoplasia* 2001 May-Jun;3(3):227-35.

(406) Morita T, Nagaki T, Fukuda I, Okumura K. Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutat.Res.* 1992 Aug;268(2):297-305.

(407) Martínez-Zaguilán R, Seftor EA, Seftor RE, Chu YW, Gillies RJ, Hendrix MJ. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin.Exp.Metastasis* 1996 Mar;14(2):176-186.

(408) De Milito A, Fais S. Proton pump inhibitors may reduce tumour resistance. *Expert Opin.Pharmacother.* 2005 Jun;6(7):1049-54.

(409) De Milito A, Fais S. Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors. *Future Oncol.* 2005 Dec;1(6):779-86.

(410) Luciani F, Spada M, De Milito A, Molinari A, Rivoltini L, Montinaro A, et al. Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. *J.Natl.Cancer Inst.* 2004 Nov;96(22):1702-13.

(411) Raghunand N, Martínez-Zaguilán R, Wright SH, Gillies RJ. pH and drug resistance. II. turnover of acidic vesicles and resistance to weakly basic chemotherapeutic drugs. *Biochem.Pharmacol.* 1999 May;57(9):1047-58.

(412) Murakami T, Shibuya I, Ise T, Chen ZS, Akiyama S, Nakagawa M, et al. Elevated expression of vacuolar proton pump genes and cellular PH in cisplatin resistance. *Int.J.Cancer* 2001 Sep;93(6):869-74.

(413) Zhang P, Zhang Z, Zhou X, Qiu W, Chen F, Chen W. Identification of genes associated with cisplatin resistance in human oral squamous cell carcinoma cell line. *BMC Cancer* 2006 Sep;6:224.

(414) Kluza J, Lansiaux A, Wattez N, Mahieu C, Osheroff N, Bailly C. Apoptotic response of HL-60 human leukemia cells to the antitumor drug TAS-103. *Cancer Res.* 2000 Aug;60(15):4077-84.

(415) Torigoe T, Izumi H, Ishiguchi H, Uramoto H, Murakami T, Ise T, et al. Enhanced expression of the human vacuolar H⁺-ATPase c subunit gene (ATP6L) in response to anticancer agents. *J.Biol.Chem.* 2002 Sep;277(39):36534-43.

- (416) Larsson H, Mattson H, Sundell G, Carlsson E. Animal pharmacodynamics of omeprazole. A survey of its pharmacological properties in vivo. *Scand.J.Gastroenterol.Suppl.* 1985 Jun;108:23-35.
- (417) Horn J. The proton-pump inhibitors: similarities and differences. *Clin.Ther.* 2000 Mar;22(3):266-80; discussion 265.
- (418) Cianfriglia M, Cenciarelli C, Tombesi M, Barca S, Mariani M, Morrone S, et al. Murine monoclonal antibody recognizing a 90-kDa cell-surface determinant selectively lost by multi-drug-resistant variants of CEM cells. *Int.J.Cancer* 1990 Jan;45(1):95-103.
- (419) Pérez M, Somoza JM, Barros F, Gándara JM, García A. V-ATPase inhibitors and implication in cancer treatment. *Cancer Treat.Rev.* 2009 Dec;35(8):707-13.
- (420) Fais S, De Milito A, You H, Qin W. Targeting vacuolar H⁺-ATPases as a new strategy against cancer. *Cancer Res.* 2007 Nov;67(22):10627-30.
- (421) Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1988 Nov;85(21):7972-6.
- (422) Moriyama Y, Nelson N. Inhibition of vacuolar H⁺-ATPases by fusidic acid and suramin. *FEBS Lett.* 1988 Jul;234(2):383-6.
- (423) Erickson KL, Beutler JA, Cardellina II JH, Boyd MR. Salicylhalamides A and B, Novel Cytotoxic Macrolides from the Marine Sponge *Haliclona* sp. *J.Org.Chem.* 1997 Nov;62(23):8188-92.
- (424) Galinis DL, McKee TC, Pannell LK, Cardellina JH, Boyd MR. Lobatamides A and B, Novel Cytotoxic Macrolides from the Tunicate *Aplidium lobatum*†. *J.Org.Chem.* 1997 Dec;62(26):8968-9.
- (425) Kunze B, Janse R, Sasse F, Höfle G. and Reichenbach H. Apicularens A and B, New Cytostatic Macrolides from *Chondromyces* Species (Myxobacteria): Production, Physico-chemical and Biological Properties. *J.Antibiot.(Tokyo)* 1998 Aug;51(12):1075-80.
- (426) Gagliardi S, Nadler G, Consolandi E, Parini C, Morvan M, Legave MN, et al. 5-(5,6-Dichloro-2-indolyl)-2-methoxy-2,4-pentadienamides: novel and selective inhibitors of the vacuolar H⁺-ATPase of osteoclasts with bone antiresorptive activity. *J.Med.Chem.* 1998 May;41(10):1568-73.
- (427) Nadler G, Morvan M, Delimoge I, Belfiore P, Zocchetti A, James I, et al. (2Z,4E)-5-(5,6-dichloro-2-indolyl)-2-methoxy-N-(1,2,2,6,6-pentamethylpiperidin-4-yl)-

2,4-pentadienamide, a novel, potent and selective inhibitor of the osteoclast V-ATPase. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 1998 Dec;8(24):3621-6.

(428) Kim JW, Shin-Ya K, Furihata K, Hayakawa Y, Seto H. Oximidines I and II: Novel Antitumor Macrolides from *Pseudomonas* sp. *J.Org.Chem.* 1999 Jan;64(1):153-5.

(429) Sasse F, Steinmetz H, Hofle G, Reichenbach H. Archazolid, new cytotoxic macrolactones from *Archangium gephyra* (Myxobacteria). Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J.Antibiot.(Tokyo)* 2003 Jun;56(6):520-5.

(430) Shen R, Lin CT, Bowman EJ, Bowman BJ, Porco JA.Jr. Lobatamide C: total synthesis, stereochemical assignment, preparation of simplified analogues, and V-ATPase inhibition studies. *J.Am.Chem.Soc.* 2003 Jul;125(26):7889-901.

(431) Kunze B, Steinmetz H, Hofle G, Huss M, Wieczorek H, Reichenbach H. Cruentaren, a new antifungal salicylate-type macrolide from *Byssovorax cruenta* (myxobacteria) with inhibitory effect on mitochondrial ATPase activity. Fermentation and biological properties. *J.Antibiot.(Tokyo)* 2006 Oct;59(10):664-8.

(432) Petrangolini G, Supino R, Pratesi G, Bo LD, Tortoreto M, Croce AC, et al. Effect of a Novel Vacuolar-H⁺-ATPase Inhibitor on Cell and Tumor Response to Camptothecins. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2006 Sep;318(3):939-46.

(433) Niikura K. Effect of a V-ATPase inhibitor, FR202126, in syngeneic mouse model of experimental bone metastasis. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 2007 Sep;60(4):555-62.

(434) Hesselink RW, Fedorov A, Hemminga MA, Prieto M. Membrane-bound peptides from V-ATPase subunit a do not interact with an indole-type inhibitor. *J.Pept.Sci.* 2008 Apr;14(4):383-8.

(435) Boyd MR, Farina C, Belfiore P, Gagliardi S, Kim JW, Hayakawa Y, et al. Discovery of a Novel Antitumor Benzolactone Enamide Class That Selectively Inhibits Mammalian Vacuolar-Type (H⁺)-ATPases. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2001 Apr;297(1):114-20.

(436) Nishihara T, Akifusa S, Koseki T, Kato S, Muro M, Hanada N. Specific inhibitors of vacuolar type H⁽⁺⁾-ATPases induce apoptotic cell death. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1995 Jul;212(1):255-62.

(437) Rofstad EK, Mathiesen B, Kindem K, Galappathi K. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res.* 2006 Jul;66(13):6699-707.

- (438) Montcourrier P, Mangeat PH, Valembois C, Salazar G, Sahuquet A, Duperray C, et al. Characterization of very acidic phagosomes in breast cancer cells and their association with invasion. *J.Cell.Sci.* 1994 Sep;107(Pt 9):2381-91.
- (439) Rozhin J, Sameni M, Ziegler G, Sloane BF. Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Res.* 1994 Dec;54(24):6517-25.
- (440) Johnson LL, Pavlovsky AG, Johnson AR, Janowicz JA, Man CF, Ortwine DF, et al. A rationalization of the acidic pH dependence for stromelysin-1 (Matrix metalloproteinase-3) catalysis and inhibition. *J.Biol.Chem.* 2000 Apr;275(15):11026-33.
- (441) Kato Y, Lambert CA, Colige AC, Mineur P, Noel A, Franken F, et al. Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. *J.Biol.Chem.* 2005 Mar;280(12):10938-144.
- (442) Gocheva V, Joyce JA. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell.Cycle* 2007 Jan;6(1):60-4.
- (443) Bowman EJ, Graham LA, Stevens TH, Bowman BJ. The bafilomycin/concanamycin binding site in subunit c of the V-ATPases from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 2004 Aug;279(32):33131-8.
- (444) Halaban R, Patton RS, Cheng E, Svedine S, Trombetta ES, Wahl ML, et al. Abnormal acidification of melanoma cells induces tyrosinase retention in the early secretory pathway. *J.Biol.Chem.* 2002 Apr;277(17):14821-8.
- (445) Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat.Rev.Cancer.* 2004 Nov;4(11):891-9.
- (446) Volk C, Albert T, Kempinski OS. A proton-translocating H⁺-ATPase is involved in C6 glial pH regulation. *Biochim.Biophys.Acta* 1998 Jun;1372(1):28-36.
- (447) McSheehy PM, Troy H, Kelland LR, Judson IR, Leach MO, Griffiths JR. Increased tumour extracellular pH induced by Bafilomycin A1 inhibits tumour growth and mitosis in vivo and alters 5-fluorouracil pharmacokinetics. *Eur.J.Cancer* 2003 Mar;39(4):532-40.
- (448) Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 1999 Nov;59(22):5830-5.
- (449) Ohta T, Arakawa H, Futagami F, Fushida S, Kitagawa H, Kayahara M, et al. Bafilomycin A1 induces apoptosis in the human pancreatic cancer cell line Capan-1. *J.Pathol.* 1998 Jul;185(3):324-30.

- (450) Gottlieb RA, Giesing HA, Zhu JY, Engler RL, Babior BM. Cell acidification in apoptosis: granulocyte colony-stimulating factor delays programmed cell death in neutrophils by up-regulating the vacuolar H(+)-ATPase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1995 Jun;92(13):5965-8.
- (451) Xu J, Feng HT, Wang C, Yip KH, Pavlos N, Papadimitriou JM, et al. Effects of Bafilomycin A1: an inhibitor of vacuolar H (+)-ATPases on endocytosis and apoptosis in RAW cells and RAW cell-derived osteoclasts. *J.Cell.Biochem.* 2003 Apr;88(6):1256-64.
- (452) Nakashima S, Hiraku Y, Tada-Oikawa S, Hishita T, Gabazza EC, Tamaki S, et al. Vacuolar H⁺-ATPase inhibitor induces apoptosis via lysosomal dysfunction in the human gastric cancer cell line MKN-1. *J.Biochem.* 2003 Sep;134(3):359-64.
- (453) Hishita T, Tada-Oikawa S, Tohyama K, Miura Y, Nishihara T, Tohyama Y, et al. Caspase-3 activation by lysosomal enzymes in cytochrome c-independent apoptosis in myelodysplastic syndrome-derived cell line P39. *Cancer Res.* 2001 Apr;61(7):2878-84.
- (454) Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2004 Dec;36(12):2445-62.
- (455) Mortimore GE, Hutson NJ, Surmacz CA. Quantitative correlation between proteolysis and macro- and microautophagy in mouse hepatocytes during starvation and refeeding. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1983 Apr;80(8):2179-83.
- (456) Lyons JC, Kim GE, Song CW. Modification of intracellular pH and thermosensitivity. *Radiat.Res.* 1992 Jan;129(1):79-87.
- (457) Hayashi Y, Katayama K, Togawa T, Kimura T, Yamaguchi A. Effects of bafilomycin A1, a vacuolar type H⁺ ATPase inhibitor, on the thermosensitivity of a human pancreatic cancer cell line. *Int.J.Hyperthermia* 2006 Jun;22(4):275-85.
- (458) Ohta T, Arakawa H, Futagami F, Fushida S, Kitagawa H, Kayahara M, et al. A new strategy for the therapy of pancreatic cancer by proton pump inhibitor. *Gan To Kagaku Ryoho* 1996 Oct;23(12):1660-4.
- (459) Ohta T, Numata M, Yagishita H, Futagami F, Tsukioka Y, Kitagawa H, et al. Expression of 16 kDa proteolipid of vacuolar-type H(+)-ATPase in human pancreatic cancer. *Br.J.Cancer* 1996 Jun;73(12):1511-7.
- (460) Byun YJ, Lee S, Kim DJ, Lee HO, Son MJ, Yang CW, et al. Protective effects of vacuolar H⁺-ATPase c on hydrogen peroxide-induced cell death in C6 glioma cells. *Neurosci.Lett.* 2007 Oct;425(3):183-7.

- (461) Goldstein DJ, Finbow ME, Andresson T, McLean P, Smith K, Bubb V, et al. Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the 16K component of vacuolar H(+)-ATPases. *Nature* 1991 Jul;352(6333):347-9.
- (462) Andresson T, Sparkowski J, Goldstein DJ, Schlegel R. Vacuolar H(+)-ATPase mutants transform cells and define a binding site for the papillomavirus E5 oncoprotein. *J.Biol.Chem.* 1995 Mar;270(12):6830-7.
- (463) Schapiro F, Sparkowski J, Adduci A, Suprynowicz F, Schlegel R, Grinstein S. Golgi alkalization by the papillomavirus E5 oncoprotein. *J.Cell Biol.* 2000 Jan;148(2):305-15.
- (464) Huss M, Ingenhorst G, König S, Gassel M, Drose S, Zeeck A, et al. Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V(o) subunit c. *J.Biol.Chem.* 2002 Oct;277(43):40544-8.
- (465) Fernandes F, Loura LM, Fedorov A, Dixon N, Kee TP, Prieto M, et al. Binding assays of inhibitors towards selected V-ATPase domains. *Biochim.Biophys.Acta* 2006 Nov;1758(11):1777-86.
- (466) Bowman BJ, Bowman EJ. Mutations in Subunit c of the Vacuolar ATPase Confer Resistance to Bafilomycin and Identify a Conserved Antibiotic Binding Site. *J. Biol. Chem.* 2002 Feb;277(6):3965-72.
- (467) Zhang J, Feng Y, Forgac M. Proton conduction and bafilomycin binding by the V0 domain of the coated vesicle V-ATPase. *J.Biol.Chem.* 1994 Sep;269(38):23518-23.
- (468) Ma L, Center MS. The gene encoding vacuolar H(+)-ATPase subunit C is overexpressed in multidrug-resistant HL60 cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1992 Jan;182(2):675-81.
- (469) Hinton A, Bond S, Forgac M. V-ATPase functions in normal and disease processes. *Pflugers Arch.* 2009 Jan;457(3):589-98.

VIII.- ANEXOS



















ANEXO 1: DISTRIBUCIÓN DE ATP6V1C1 EN LOS DISTINTOS TEJIDOS

Distribución de *ATP6V1C1* en los distintos tejidos del organismo comparando el tejido normal con el tejido canceroso, siguiendo una escala de colores que va del azul al rojo que indica el nivel de expresión del gen (de menor a mayor), según la base de datos del **Proyecto de Anatomía del Genoma del Cáncer**.

N O R M A L

C A N C E R






	Cerebro	
	Retina	No hay Datos
	Tiroides	
	Pulmón	
	Corazón	No Aplicable
	Mama	
	Estómago	
	Páncreas	
	Hígado	
	Riñón	



Tags per
200,000



	Colon	
	Peritoneo	
	Cordón Espinal	No hay Datos
No hay Datos	Ovario	
	Placenta	No Aplicable
	Próstata	
	Médula Ósea	No hay Datos
No hay Datos	Cartílago	
	Músculo	No hay Datos
	Piel	
	Nódulo Linfático	No hay Datos
	Células Blancas Sanguíneas	No hay Datos
	Vascular	No hay Datos

ANEXO II: MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio: DETERMINACIÓN DE *ATP6V1C1* EN CITOLOGÍA DE LA CAVIDAD ORAL PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ NO INVASIVO DEL CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS.

Se le ha pedido que participe en un estudio de investigación. Antes de decidir si va a participar es importante que entienda por qué se hace esta investigación, cómo se utilizará su información, qué implicaciones tiene el estudio y los posibles beneficios, riesgos y molestias que conlleva. Tómese el tiempo necesario para leer con detenimiento la siguiente información y hable de ello con su dentista.

Información general y finalidad del estudio

Se le ha pedido que participe en este estudio porque ha sido usted diagnosticado de un carcinoma oral de células escamosas (COCE).

En el estudio participarán otros pacientes que como usted padecen un COCE y otros con lesiones cuyo diagnóstico diferencial haya que hacerlo con COCE, que acudan al Servicio de Cirugía Maxilofacial del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, no tratados previamente. Se le tomarán dos muestras citológicas, una para su estudio citopatológico y otra para estudiar la expresión genética de gen *ATP6V1C1*. El diagnóstico de certeza se realizará mediante biopsia de la lesión, que es el procedimiento habitual en estos pacientes.

En la cavidad oral existen múltiples lesiones con aspecto ulcerado, y a pesar de que muchas de ellas son de carácter benigno (liquen plano erosivo, aftas, etc), es necesario establecer el diagnóstico diferencial con el carcinoma oral de células escamosas (COCE). El COCE es una entidad relativamente frecuente, con una elevada morbi mortalidad cuando se diagnostica en estadios avanzados, y con un mejor pronóstico si se diagnostica precozmente. Las lesiones que aparecen en el COCE pueden ser visualizadas fácilmente en la inspección de la cavidad oral que realizan tanto los médicos de atención primaria como dentistas. Por su aspecto clínico, los COCE son difícilmente distinguibles de las lesiones benignas.

Para el diagnóstico se requiere biopsia con confirmación anatomopatológica, lo que implica una prueba cruenta y hace necesaria la participación de otro personal especializado. En caso de que la determinación genética de *ATP6V1C1* en la citología fuese una prueba eficaz en el diagnóstico del COCE, tal como es la pretensión de este proyecto, los profesionales de la atención primaria y los dentistas dispondrían de una prueba de fácil ejecución y no cruenta, con la que poder cribar a los pacientes con sospecha diagnóstica de COCE, enviando a estos pacientes con resultado positivo a las unidades hospitalarias de referencia.

La participación es voluntaria

La decisión de participar o no en el estudio es sólo suya. Si decide no participar en el estudio, debe saber que no se verá perjudicado de ningún modo, y que ello no afectará en modo alguno al tratamiento y la atención médica que tiene derecho a recibir. Si acepta participar tendrá que firmar este formulario de consentimiento informado. Si decide participar podrá retirarse del estudio en cualquier momento, sin que la atención que reciba en el futuro se vea afectada y sin necesidad de dar ningún tipo de explicación.

De la misma manera, el médico responsable del estudio (Prof. Dr. Abel García García) podría decidir en algún momento que seguir participando en el estudio no redunde en su interés y podrá retirarle del mismo. Así mismo, será informado si sale a la luz cualquier nueva información sobre el/los producto(s) del estudio que pueda influir en su decisión de continuar en él. Cuando deje de participar en el estudio tendrá que someterse a todos los procedimientos de retirada del mismo que el médico del proyecto considere necesarios para su seguridad. Si no desea participar en el estudio, su médico del proyecto proseguirá con el tratamiento previsto en este centro clínico.

¿Qué pasará si decido participar?

Que le tomaremos unas muestras citológicas para realizar un análisis citopatológico y molecular de sus células, para realizar un diagnóstico citológico y evaluar los niveles de expresión de *ATP6V1C1*, un gen que parece estar implicado en la carcinogénesis y en el pronóstico del tumor.

Posibles efectos secundarios, riesgos y molestias

Los efectos secundarios que puede presentar son los derivados de la toma de muestra citológica mediante cepillos o curetas. Puede presentar molestias durante el raspado, inflamación, edema, enrojecimiento o ligero sangrado tras la toma de las muestras. En cuanto a la biopsia, que es obligada para el diagnóstico, los riesgos son mínimos siempre que la técnica se realice correctamente y las molestias incluyen hemorragias autolimitadas, disconfort postoperatorio y dolor.

¿Obtendré algún beneficio por participar?

La participación en este estudio no representa ninguna ventaja ni en el diagnóstico ni en el tratamiento de su enfermedad.

Es posible que durante este estudio o después de finalizarlo no experimente ningún efecto beneficioso directo en su salud, pero su participación en el estudio aportará información sobre el diagnóstico citológico del cáncer que podría beneficiar a otras personas.

Tratamiento de los datos personales y los resultados

Durante el estudio, recogeremos algunos datos personales suyos, como la fecha de nacimiento, el sexo y datos sobre su estado de salud o sus enfermedades (pasadas y actuales, etc.), así como los resultados de las evaluaciones del estudio.

El médico del estudio comunicará los datos personales recogidos durante el estudio ("datos del estudio") a las unidades encargadas del análisis de las muestras. Sólo el médico del estudio y su personal podrán acceder a sus datos

del estudio. En la Unidad de Medicina Oral, sus datos se almacenarán y analizarán manualmente y con medios informáticos. Sus respuestas y resultados se tratarán de modo que no puedan acceder a ellos personas no autorizadas.

A fin de supervisar la correcta ejecución del estudio, representantes autorizados o las autoridades supervisoras nacionales o extranjeras podrán revisar los datos del estudio y compararlos con los datos que figuran en su historia clínica. Para acceder a su historia clínica, estos representantes deberán contar primero con la autorización del médico del estudio.

La recogida y tratamiento de sus datos del estudio servirá para investigar y desarrollar el o los objetivos descritos en este formulario de consentimiento informado. Los resultados también se podrán publicar en revistas científicas, pero sin revelar su identidad.

La Unidad de Medicina Oral podrá compartir sus datos del estudio con otras unidades de su especialidad, quiénes emplearán sus datos del estudio sólo para los fines descritos arriba. La Unidad podrá transferir sus datos del estudio a países de la Unión Europea o de fuera de la Unión Europea (Estados Unidos), con estos fines y para facilitar datos a las autoridades sanitarias. La legislación de algunos países no garantiza el mismo nivel de protección de datos que la legislación vigente en la Unión Europea en lo referente al tratamiento de los datos personales. No obstante, todos los datos transferidos se codificarán como se ha descrito arriba.

Tiene derecho a solicitar información sobre los datos personales que el médico del estudio podrá conservar sobre usted. También tiene el derecho a solicitar la rectificación de cualquier error en sus datos personales. Si desea realizar una petición, póngase primero en contacto con el médico del estudio. Las señas de contacto del médico del estudio aparecen al final de este formulario.

Si retira su consentimiento, el médico del estudio dejará de recoger sus datos del estudio. No obstante, la Unidad podrá seguir utilizando la información obtenida sobre usted antes de la retirada de su consentimiento.

En cuanto a las muestras biológicas obtenidas durante el estudio, éstas serán destruidas una vez terminado el mismo.

Contactos del estudio

Si sufre una lesión relacionada con el estudio o tiene alguna pregunta sobre el mismo, o el procedimiento/tratamiento, póngase en contacto con:

Médico responsable del estudio: Prof Abel García , nº teléfono 981563100 Ext. 12357

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

Sujeto participante en la investigación

He sido informado verbalmente sobre el estudio y he leído la información escrita adjunta. He tenido la oportunidad de comentar el estudio y de plantear preguntas acerca de él. He tenido tiempo suficiente para reflexionar sobre mi participación y tomar una decisión. Acepto:

- Participar en el estudio.
- Que se recojan y procesen mis datos personales, del modo descrito en este formulario, incluida la comunicación de mis datos personales a la Unidad de Medicina Oral y a las entidades supervisoras de dentro y fuera de la Unión Europea (Estados Unidos).
- Que una persona designada por la Unidad o un representante de las autoridades acceda a mi historia clínica para comparar la información comunicada en el estudio con la información contenida en mi historia clínica.

Sé que mi participación en el estudio es totalmente voluntaria y que puedo retirarme en cualquier momento sin que ello influya en la atención médica que pueda recibir en el futuro.

Fecha *(a rellenar por el paciente)*

Firma del paciente

Nombre impreso del paciente (EN MAYÚSCULAS)

Investigador

He explicado el diseño y la finalidad del estudio al paciente participante en la investigación arriba indicado.

Fecha

Firma del investigador

Nombre impreso del investigador (EN MAYÚSCULAS)

El paciente recibe una copia firmada de este consentimiento informado

ANEXO III: INHIBIDORES DE LOS REGULADORES DEL pH

A. V-ATPase inhibitors

Bafilomycin A1
Concanamycin A (Folimycin)/B
NEM: N-ethyl-maleimide
NBD-Cl: 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole
DCCD: N,N0-dicyclohexyl-carbodiimide
Destruxin B
Salicylhalamide A
Lobatamide
Oximidine

B. NHE inhibitors

Guanidine derivatives

(i) Benzoylguanidine
Cariporide, HOE642: 4-isopropyl-3-methylsulphonylbzoyl-guanidine methanesulphonate
Hoe 694: 3-methylsulfonyl-4-piperidinobenzoyl, guanidine hydrochloride
FR183998: 5-(2,5-dichlorothiophen-3-yl)-3-[(2-dimethylaminoethyl)carbamoyl]benzoylguanidine dihydrochloride
FR168888: 5-hydroxymethyl-3-(pyrrol-1-yl) benzoylguanidine methanesulfonate
EMD 85131: 2-methyl-5-methylsulfonyl-1-(1-pyrrolyl)-benzoylguanidine

(ii) Carbonylguanidine
Zoniporide or CP-597,396: [1-(Quinolin-5-yl)-5-cyclopropyl-1H-pyrazole-4-carbonyl]guanidine hydrochloride monohydrate
TY-12533: 6,7,8,9-tetrahydro-2-methyl-5H-cyclohepta[b]pyridine-3-carbonylguanidine maleate
CAS 181048-29-3, MS-31-050: 2-(2-methylphenyl)-5,7-dimethoxy-4-quinolyl carbonylguanidine dihydrochloride
CAS 181048-36-2, MS-31-038: 2-phenyl-8-(2-methoxyethoxy)-4-quinolyl carbonylguanidine bismethanesulfonate
KB-R9032: N-(4-isopropyl-2,2-dimethyl-3-oxo-3,4-dihydro-2H-benzo[1,4]oxazine-6-carbonyl)guanidine (4b) methanesulfonate salt

(iii) Others
T-162559: (5E,7S)-[7-(5-fluoro-2-methylphenyl)-4-methyl-7,8-dihydro-5(6H)-quinolinylideneamino] guanidine dimethanesulphonate

Amiloride derivatives

DMA: 50-(N,N-dimethyl)-amiloride
HMA: 5-(N,N-hexamethylene) amiloride
MIA: 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride

C. Bicarbonate transporter inhibitor

Triflocin: 4-(a,a,a-trifluoro-m-toluidino)-nicotinic acid
DIDS: 4,40-diisothiocyanato-stilbene-2,20-disulfonic acid
SITS: 4-acetamido-40;isothiocyanostilbene-2,20-disulfonic acid
S3705

D. MCT inhibitors

DIDS: 4,40-diisothiocyanato-stilbene-2,20-disulfonic acid
a-cyano-4-hydroxycinnamate (a-CHC)
p-Chloromercuribenzenesulphonate
Diethyl pyrocarbonate
Quercetin

ANEXO IV: PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS

- Pérez M, Somoza JM, Barros F, Gándara JM, García A. V-ATPase inhibitors and implication in cancer treatment. *Cancer Treat.Rev.* 2009 Dec;35(8):707-13.

Factor de impacto: 4.729.

- Pérez M, Reboiras MD, Gándara P, García A. Role of V-ATPases in solid tumors: importance of the subunit C (review). *Int.J.Oncol.* 2009 Jun;34:1513-20.

Factor de impacto 2.295.

- Pérez M, Somoza JM, Barros F, Reboiras MD, Gándara JM and García A. Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer. *Oncol.Rep.* 2009 Dec;22(6):1277-82.

Factor de impacto: 1.524.

- Pérez M, Somoza J, Barros F, Reboiras MD, Gándara P, Gándara JG, García A. Exfoliative Cytology for diagnosing of oral cancer. *Biotech.Histochem.* 2009 Aug;25:1-11.

Factor de impacto: 1.286.

- Pérez M, Somoza JM, Barros F, Gándara JM, García A. Multidrug resistance in oral squamous cell carcinoma: The role of vacuolar ATPases. *IN PRESS in Cancer Lett.*

Factor de impacto: 3.501.

- Pérez M, Reboiras MD, Somoza JM, Barros F, Gayoso P, Gándara JM, García A. Measurement of ATP6V1C1 expression in brush cytology samples as a diagnostic and prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *IN PRESS in Cancer Biol.Ther.*

Factor de impacto: 2.818.



NEW DRUGS

V-ATPase inhibitors and implication in cancer treatment

Mario Pérez-Sayáns^{a,*}, José Manuel Somoza-Martín^{a,c}, Francisco Barros-Angueira^{b,d},
José Manuel Gándara Rey^{a,e}, Abel García-García^{a,f}

^a Entreríos s/n, Santiago de Compostela C.P. 15782, Spain

^b Unidad de Medicina Molecular - Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Edificio de Consultas planta -2, Hospital Clínico Universitario C.P. 15706, Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 June 2009

Received in revised form 3 August 2009

Accepted 6 August 2009

Keywords:

V-ATPase inhibitors

Tumor metastasis

Tumor cell growth

Chemosensitivity

V-ATPases

Concanamycin

Bafilomycin

Salicylhalamide

Archazolid

Indolyis

SUMMARY

Acidity is one of the main features of the tumors. The V-ATPase is the primary responsible for the control of tumor microenvironment by proton extrusion to the extracellular medium. The acid environment favors tissue damage, activation of destructive enzymes in the extracellular matrix, the acquisition of metastatic cell phenotypes as well as increasing the destructive capacity. The application of specific inhibitors of V-ATPases, can decrease the acidity of tumor and may allow the reduction of tumor metastasis, acting on the survival of tumor cells and prevent the phenomena of chemoresistance. Among the most important inhibitors can be distinguished benzolactone enamides (salicylhalamide), lobatamide A and B, apicularen, indolyis, oximidine, macrolactone archazolid, lobatamide C, and cruentaren. The latest generation of inhibitors includes NiK12192, FR202126, and PPI SB 242784. The purpose of this paper is to describe the latest advances in the field of V-ATPase inhibitors, describe further developments related to the classic inhibitors, and discuss new potential applications of these drugs in cancer treatment.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

V-ATPase is an enzyme with multiple subunits that is involved in receptor-mediated endocytosis,¹ intracellular trafficking and acidification of late endosomes,^{2–6} the transport of lysosomal enzymes from the Golgi apparatus to lysosomes,^{6,7} and the creation of the microenvironment necessary for proper protein transport, exchange and secretion.⁸ This enzyme is composed of a cytosolic V1 domain and a transmembrane V0 domain, in which the V1 domain consists of three A subunits, three B subunits, two G subunits, and the C, D, E, F, and H subunits and the V0 domain consists of five different subunits (a, c, c', c'', and d).²

Scientific evidence suggests that the acidic tumor microenvironment is key to managing cancer progression and metastasis. In particular, V-ATPases play a major role in metastasis tumor development because many tumor cells secrete lysosomal enzymes that participate in the extracellular matrix degradation necessary for metastatic invasion. These enzymes are most active at low optimal pH; moreover, V-ATPases are responsible for microenvironment acidification.^{2,9} Among the many mechanisms that regulate the tumor microenvironment, V-ATPases are especially significant because they can be inhibited by proton pump inhibitors.¹⁰

Initial attempts to block V-ATPases were made after bafilomycin and concanamycin were discovered in 1988.¹¹ In addition, Moriyama et al. described V-ATPase inhibition as a target for therapy by blocking assembly and reducing H⁺ secretory activity with fusidic acid and suramin.¹²

New molecules capable of inhibiting V-ATPase to a greater or lesser extent via different mechanisms of action were later discovered. Such molecules include benzolactone enamides salicylhalamide,¹³ lobatamide A and B,¹⁴ apicularen,¹⁵ indolyis,^{16,17} oximidine,¹⁸ macrolactone archazolid,¹⁹ lobatamide C,²⁰ and cruentaren.²¹ The latest generation of inhibitors include NiK12192,^{22,23} FR202126,²⁴ and PPI SB 242784.²⁵

* Corresponding author. Address: Facultad de Odontología, Entreríos s/n, Santiago de Compostela C.P. 15782, Spain. Tel.: +34 626233504; fax: +34 986295424.

E-mail addresses: perezsayans@gmail.com (M. Pérez-Sayáns), cinolo@gmail.com (J.M. Somoza-Martín), francisco.barros@usc.es (F. Barros-Angueira), josemanuel.gandara@usc.es (J.M.G. Rey), abel.garcia@usc.es (A. García-García).

^c Tel.: +34 619099006.

^d Tel.: +34 981951490.

^e Tel.: +34 639814869.

^f Tel.: +34 606461881.

V-ATPase inhibitors can act on the soluble domain or at membrane sites. At low micromolar (μM) concentrations, soluble domain inhibitors, such as N-ethylmaleimide (NEM) and 4-chloro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole chloride (NBD-Cl), successfully inhibit ATP hydrolysis.²⁶ ATPase-membrane inhibitors, such as dicyclohexylcarbodiimide (DCC), inhibit the subunit c of V-ATPase.²⁷

Bafilomycin A1 and concanamycin A at nanomolar (nM) concentrations selectively inhibit V-ATPase, and can also inhibit growth and induce apoptosis in different human cells lines. Recently, specific V-ATPases inhibitors for mammals belonging to the benzolactone enamide class, such as salicylihalamide, lobatamides and oximidines, have also shown promise as anticancer agents.^{11,28–30}

The purpose of this paper is to describe the latest advances in the field of V-ATPase inhibitors, describe further developments related to the classic inhibitors, and discuss new potential applications of these drugs in cancer treatment.

Classes of V-ATPase Inhibitors

- 1st Family: plecomacrolide antibiotics (concanamycin and bafilomycin);
- 2nd Family: benzolactone enamides;
 - A. Salicylihalamide
 - B. Apicularens
 - C. Lobatamides
 - D. Oximidines
 - E. Cruentaren
- 3rd Family: archazolid;
- 4th Family: indolyis;
- 5th Family: late-generation V-ATPase inhibitors.

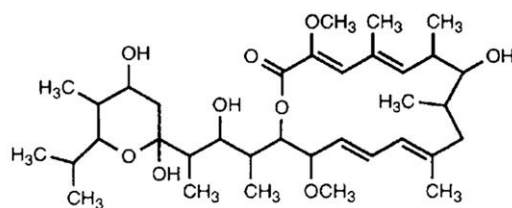
Several other inhibitors are specific to V-ATPase but have no effect on mammalian cells and, therefore, are not discussed in this review or only mentioned briefly: destruxins (cyclic hexadepsipeptides),³¹ prodigiosins (tripyrrroles),³² chondropsins,³³ and diphyllin.³⁴

1st Family: plecomacrolide antibiotics (concanamycin and bafilomycin)

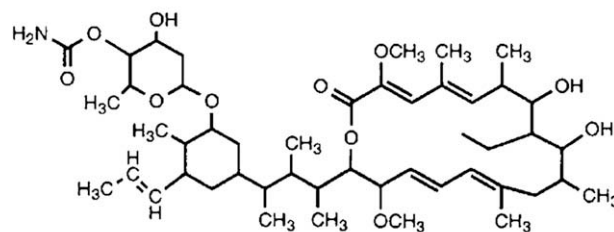
The V-ATPase inhibitors studied most thoroughly and used most often are macrolide antibiotics with 18-membered lactone rings, namely, bafilomycins and concanamycins (Fig. 1). The agents have been isolated from *Streptomyces* species and were originally thought to be P-type ATPase inhibitors.¹¹

The enzyme binding site was unknown for more than a decade, although studies of V-ATPases in chromaffin granules suggest that subunit a of the V0 domain is the binding site for plecomacrolides. The addition overage of the complex V0 restores the activity of vesicular proton pumps.³⁵ However, it appears that plecomacrolides also interact with subunit c of the V0 domain, as seen in the decreased sensitivity to bafilomycin when amino acid exchange is increased in this subunit³⁶ and by radioactive-labeled bafilomycin with specific binding to this subunit.^{37,38} The development of the crystal structure from the Na⁺V0 ring of *Enterococcus hirae* has revealed the preferential binding site to subunit c.^{39,40} Thus the mechanism of action consists of inhibiting proton translocation by preventing the rotation of ATP6V0C multimer, which causes intracytoplasmic acidosis.⁴¹

When used at low concentrations, bafilomycin and concanamycin are highly specific for V-ATPases. They strongly inhibit the growth of *Neurospora crassa*, but have no effect on strains with inactive V-ATPases, which indicates that their action is specific to this enzyme.⁴² In addition to being V-ATPase inhibitors, bafilomycin and concanamycin have also been found to have ionophoric properties as a potassium transporter that causes mitochondrial damage and cell death.⁴³



Bafilomycin A1



Concanamycin A

Fig. 1. Chemical structure of bafilomycin A1 and concanamycin. Modified from Bowman and Bowman⁴⁶.

Bafilomycin and concanamycin are commercially available, and various laboratories have developed *in vitro* synthesis processes for experimental purposes.⁴⁴

2nd Family: benzolactone enamides

Benzolactone enamides contain salicylic acid residue and a lateral enamide chain joined by a variable bond to form a lactone ring. Benzolactone enamides are of interest because they inhibit animal V-ATPases at low nM concentrations but do not affect yeast V-ATPases.⁴⁵ The benzolactone core confers high cytotoxicity.¹⁴

The members of this family have been isolated from sea sponges, ascidians, and Gram-negative bacteria. Its toxicity pattern in NIC-60 cancer cells was similar to the bafilomycin pattern, and the substances are the subject of current research at various organic synthesis laboratories.⁴⁶

Important members of benzolactone enamides include salicylihalamide A, apicularen A, lobatamide A, oximidine I, and cruentaren (Fig. 2).

Salicylihalamide A is the first member of a growing class of macrocyclic salicylate natural products that induce a variety of interesting phenotypes into mammalian cell cultures.⁴⁷ Salicylihalamide is characterized as a highly differentiated cytotoxin and a potent inhibitor for mammalian V-ATPases. The substance shows considerable cytotoxicity against tumor cell lines. Salicylihalamide is also a selective V-ATPase inhibitor in mammals, and differs from earlier known V-ATPase inhibitors, such as bafilomycins and concanamycins, that do not discriminate between mammalian and non-mammalian V-ATPases.⁴⁸ Because salicylihalamide has potent antitumor activity and a simple structure, it is a promising anticancer candidate. Its synthetic analogues are potent V-ATPase inhibitors, which suggests that these potential anticancer drugs should be further investigated.^{13,49}

Apicularens are antibiotics produced by myxobacteria (*Chondromyces*).^{15,50} Apicularen A shows no antimicrobial activity but is highly toxic for human and animal cell cultures; moreover, it is chemically related to the salicylihalamides A and B from the sea sponge (*Haliclona* species).

Lobatamides were discovered by Galinis et al., from the *Tunicate Aplidium lobatum*¹⁴ and extensively investigated by Shen et al., who discovered that the substitution of enamide NH, salicylate,

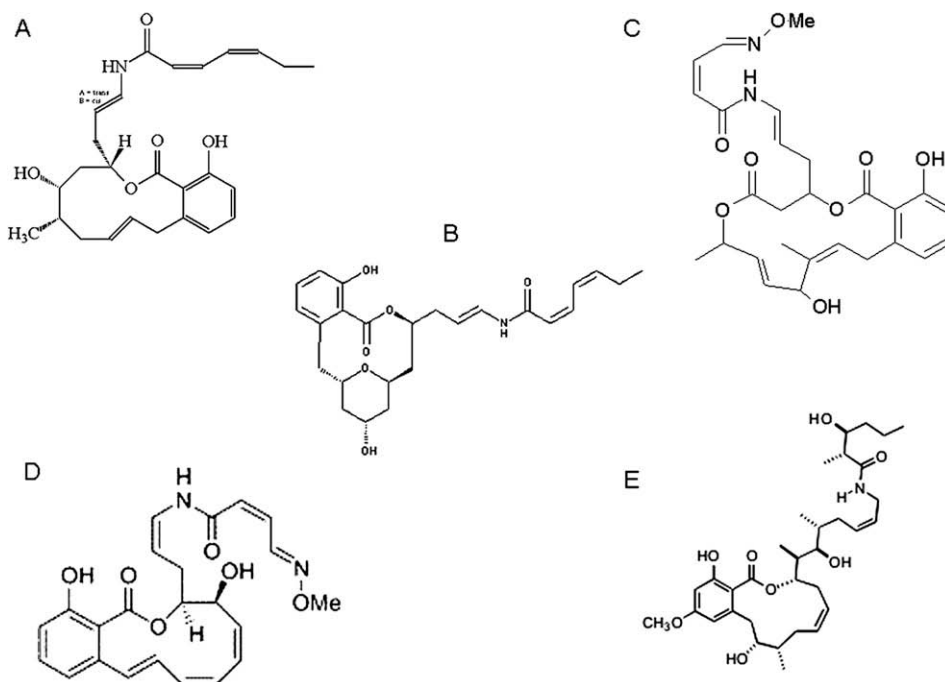


Fig. 2. Chemical structure of benzolactone enamides derivatives. (A) Salicylihamide. (B) Apicularens. (C) Lobatamides. (D) Oximidines. (E) Cruentaren.

and phenyl salicylate was the key to achieving complete V-ATPase inhibition.^{20,51}

Oximidines were introduced by Kim et al. as antitumor macrocyclics originating from *Pseudomonas* sp. In particular, oximidines I and II selectively inhibit the growth of 3Y1 cells transformed with E1A, ras, and src oncogenes.¹⁸

Cruentaren was discovered from active metabolites of the *Byssosvorax cruenta* myxobacterium and exhibits high cytotoxicity on mammalian and fungal cells.²¹ Although it was initially thought to be a potent V-ATPase inhibitor, the agent has been shown to inhibit mitochondrial F-ATPases at nanomolar concentrations.⁵²

3rd Family: archazolid

Archazolid is a recently discovered compound produced by myxobacteria *Archangium gephyra* and *Cystobacter violaceus*.^{53,54} The main structure is composed of a macrocyclic lactone ring with a thiazole side chain (Fig. 3).⁵⁰ Archazolid is highly effective against various mammalian cell line cultures in the subnanomolar range⁵⁵ and leads to the formation of vacuoles in the endoplasmic reticulum, a phenomenon typical for V-ATPase inhibitors.¹⁹ Archazolid also prevents lysosome acidification, supporting the hypothesis that V-ATPase was blocked by antibiotics.⁵⁰

4th Family: indolyis

Structural studies of bafilomycin and concanamycin have revealed the main structural elements necessary for the biological activity of V-ATPases inhibitors, thus leading to the design and synthesis of new, structurally simpler inhibitors such as indolyis¹⁶ (Fig. 4). The most potent inhibitor is INDOL0, and electron paramagnetic resonance (EPR), fluorescence spectroscopy, and resonance energy transfer spectroscopy have shown that INDOL0 interacts with transmembrane subunit c segments, which indicates a mechanism of action similar to bafilomycin.^{38,56,57}

INDOL5 and INDOL6 are two other spin-labeled derivatives from INDOL0, called.⁵⁶

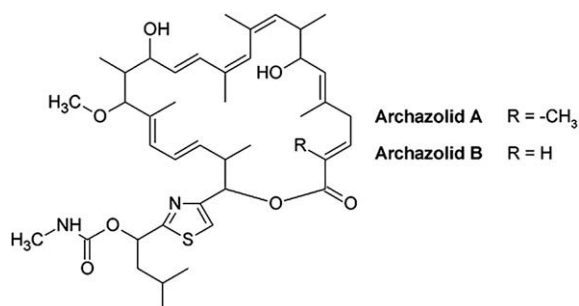


Fig. 3. Chemical structure of archazolid A and B. Modified from Huss and Wiczorek [107].

5th Family: next-generation V-ATPase inhibitors

Use of the new V-ATPase inhibitor NiK12192 (derivative of the indole group), enhances inhibition of the antitumor activity of camptothecin chemotherapy agents in two colon carcinoma cell lines and in non-small cell lung cancer.^{22,58}

The binding mechanism of the new V-ATPase inhibitors is not completely understood. It seems that the potent V-ATPase inhibitor, SB 242784 (synthetic indole derivative), shows no interaction with TM7 peptides (short subunit peptides where proton translocation takes place in the V-ATPases).²⁵

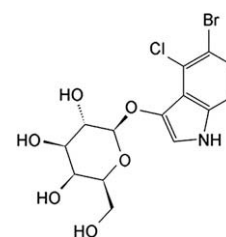


Fig. 4. Basic chemical structure of indolyis.⁵⁶

Another study has demonstrated the efficacy of FR202126 (osteoclast specific V-ATPase inhibitor) in reducing osteolysis induced by metastatic lung cancer.²⁴

A potent alkylator, 3-bromopyruvate (3-Br PA) appears to cause a dramatic disruption of pH gradients in mice thymocytes and in hepatocellular carcinoma cells. The mechanism of action appears to be V-ATPase inhibition, which leads to lysosomal destabilization and cell death.⁵⁹

Tributyltin chloride (TBTCl), classically used as an antiseptic, appears to have inhibitory effects on ATP hydrolysis in the V-ATPases of eukaryotic cells, with potential applications in osteoporosis and cancer.⁶⁰

Other recent inhibitors apparently do not affect cancer, but do prevent bone destruction in induced arthritis by inhibiting osteoclasts, as in the case of FR177995.⁶¹ Other inhibitors, such as FR167356, may even discriminate between osteoclast V-ATPases and lysosomal V-ATPases, a fact that has potential therapeutic implications.⁶²

Role of V-ATPase inhibitors in cancer

Tumor metastasis

The development and maintenance of the proton gradient present in tumors is due directly to the ability of tumor cells to secrete protons (H^+)^{9,63} acidify the extracellular medium,^{64,65} and keep the cytosolic pH alkaline.⁶⁶ This ability also increases with tumor aggressiveness.^{67,68} In addition, low pH may cause extracellular matrix (ECM) degradation and remodeling through activation of proteolytic enzymes which contribute to invasion and cancer metastasis.^{69,70} Proteases need low extracellular pH to optimize their activation, including metalloproteinases (MMP), morphogenetic bone metalloproteinases (protein type 1), tissue serine proteases, and adamalysin-related proteinases. Among them, MMPs are the proteases basically involved in degradation and remodeling of all extracellular matrix (ECM) structural components.^{71–75}

Senoune et al. assessed the effect of bafilomycin A1 in breast tumor cells and found that cytoplasmic pH recovery was inhibited in response to acid load, in both highly and lowly metastatic cells, although to a greater extent in highly metastatic cells.⁷⁶ This suggests that V-ATPases in the plasma membrane are involved in the acquisition of a more metastatic phenotype and that the use of V-ATPase inhibitors allows distant metastasis to be minimized (Fig. 5).

Using RNA interference techniques, Lu et al. found that distant metastasis could be delayed and suppressed in human hepatocellular carcinoma *in vitro* by reducing proton extrusion and gelatinase activity through the inhibition of V-ATPase subunit c (ATP6L).⁷⁷ This fact is consistent with subunit c block by bafilomycin and concanamycin, as this is their main binding site to V-ATPase.⁴¹

In tyrosinase-positive amelanotic melanoma cells, inactive tyrosinase accumulates in the endoplasmic reticulum because the presence of aberrant V-ATPases blocks trafficking through secretory pathways. The use of V-ATPase inhibitors, such as bafilomycin A1 or concanamycin A, improves transport, demonstrating the involvement of this enzyme and preventing conditions that favor metastatic dissemination.⁷⁸

Hence, both *in vitro* or *in vivo*, V-ATPases are a target for anti-cancer therapeutic agents, either directly by regulating the pH gradient in the tumor environment or indirectly by preventing ECM protease activation.¹⁰

Tumor cell growth and survival

V-ATPases may also play a significant role in tumor cell survival by regulating pH and preventing apoptosis. As previously reported, plasma membrane V-ATPases help regulate cytosolic pH in macrophages and neutrophils.⁷⁹ This mechanism may also be used by tu-

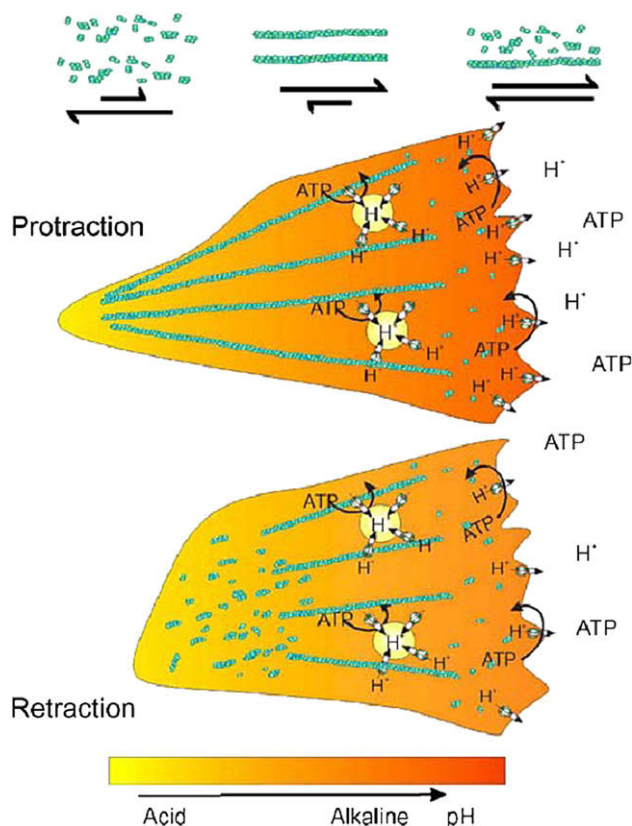


Fig. 5. Proposed mechanism by which overexpression of pmV-ATPase at the leading edge of the cell modulates cell migration/invasion. The proposed model should be viewed as a framework to explain how pmV-ATPases determine the acquisition of an invasive phenotype needed for angiogenesis and metastasis. Changes in pH_{cyt} are critical for establishing cell polarity needed for cell movement. A critical step in directed motility and migration is the asymmetric actin polymerization at the leading edge. Increase in pH_{cyt} promotes recruitment of cofilin and dynamic actin remodeling at the leading edge of migratory cells. Therefore, the pH_{cyt} fluctuations that are needed to control dynamic assembly/disassembly of microtubules/microfilaments will allow protrusion at the leading edge and retraction at the lagging edge by changing the rigidity of the cytoskeleton structure favoring the sol-gel transition. Also, the high density of pmV-ATPase at the leading migratory edge in invasive cells suggests that there is increase acidity at the extracellular milieu via pmV-ATPase. This acid release provides an optimum extracellular environment for proteases to degrade the extracellular matrix and therefore to allow cell invasion.⁶⁶

mor cells, which produce more H^+ due to high glycolytic activity.⁸⁰ Treatment with V-ATPase inhibitors lowers H^+ extrusion, both *in vitro* and *in vivo*.^{81,82}

Bafilomycin A1 was assessed as a potential anticancer agent because it inhibits cell proliferation and tumor growth. Although this effect has been attributed to the inhibition of intracellular acidosis by blocking V-ATPases, the precise mechanism remains unknown.⁴¹ A study conducted by Lim et al., hypothesized that bafilomycin A1 and its analogue, concanamycin A, stimulate a tumor growth factor, hypoxia-inducible 1 α (HIF-1 α).⁸³ The interaction of bafilomycin with HIF-1 α increases with hypoxia, causing strong induction of the p21 gene which, in turn, leads to cell cycle detection in cancer cells.⁸⁴

The effect of bafilomycin on tumor growth *in vivo* has been previously investigated in pancreatic tumor xenografts.⁸⁵ In fact, bafilomycin injections slowed growth in tumors larger than 300 mm.³ In fibrosarcomas, however, the effect is seen much earlier, possibly in relation to HIF-1 α levels. Lim et al. believe that bafilomycin inhibits the growth of large tumors subject to elevated levels of hypoxia more than that of small tumors, which would explain the dramatic effect in tumors larger than 400–500 mm.^{3,84}

Therefore, it appears that bafilomycin may be a potential therapeutic agent for large solid tumors.

V-ATPase inhibition has also been shown to trigger apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms^{86,87} and bafilomycin and concanamycin induce apoptosis in other types of cells, including neutrophils⁸⁸ and osteoclasts.⁸⁹

Morimura et al. described the growth-inhibiting effect of apoptosis stimulation in human hepatoblastomas using bafilomycin A1. In particular, electron microscopy, morphological observations, and flow cytometry showed higher apoptotic cell ratios and diminished cell reproduction. In addition, the analysis with gene chip gene expression showed that 3 of the 27 genes related to V-ATPases were more weakly expressed in the Bafilomycin-A1-treated cells than in the Bafilomycin-A1-free cells (ATP6V0D2, ATP6V1B1 and ATP6V0A1) in the cells treated with bafilomycin A1. Cell growth inhibition in normal liver cells was insignificant. These results support the theory that the inhibition of V-ATPase-specific genes have minimal effects on normal cells.⁹⁰

In the case of human gastric cancer cells, Nakashima et al. investigated the mechanism of apoptosis induced by bafilomycin A1. Bafilomycin inhibits the growth of MKN-1 cancer cells through apoptosis proven by DNA ladder formation and the TUNEL method. Flow cytometry was used to measure alterations in lysosomal pH, which increased in the presence of bafilomycin. Caspase-3 activity was also increased by bafilomycin; such findings suggest that bafilomycin A1 induces apoptosis in MKN-1 cells mediated by proteases released after lysosomal dysfunction, followed by caspase-3 activation of the cytochrome c-independent manner.^{91,92}

A study conducted by Wu et al. has shown that bafilomycin A1 suppresses macroautophagy by preventing lysosome acidification.⁹³ Macroautophagy is a protein degradation pathway that allows increased cell survival under stress and in cancer.^{94,95} Macroautophagic inhibition in HT-29, HCT-116, and SW1116 colon cancer cells is accompanied by down-regulation of cyclin D and E and up-regulation of p21^{Cip1} and various caspases, causing an anti-proliferative effect.⁹³

It is well known that the thermal sensitivity of tumor cells may be increased by lowering intracellular pH and inhibiting the homeostatic mechanisms of pH, which are mainly controlled by V-ATPases.^{23,96,97} Hayashi et al. concluded that human pancreatic cancer cells (AsPC-1) treated with bafilomycin A1 in combination with EIPAs (Na⁺/H⁺ exchange pump inhibitors) led to lower intracellular pH and higher thermal sensitivity of cancer cells, which favored delayed cell growth.⁹⁸

Cancer cells are more likely to express V-ATPase than normal cells, causing abnormalities in the acidic microenvironment and affecting cancer cell growth and infiltration significantly.^{23,64,65} Moreover, neoplastic cells are more sensitive to bafilomycin A1 than normal cells, a fact that may be used in anticancer therapy.⁹⁹

Contribution to chemoresistance

In tumor cells, V-ATPases enhance resistance to antineoplastic drugs. A series of drug-resistant tumor cells show greater expression of V-ATPase subunits^{100–102} and V-ATPase inhibitors may enhance drug build-up in some tumor cells.¹⁰³

Murakami et al. found overexpression of the ATP6C gene or subunit C in cisplatin-resistant tumors, a fact consistent with the increased number and activity of V-ATPases in cases of chemoresistance and the importance of this subunit in pump regulation.^{100,104} To determine if proton pump overexpression affected proton pump inhibitor sensitivity, these authors exposed cells to several concentrations of bafilomycin and found that cisplatin-resistant cells developed slight sensitivity to bafilomycin at low concentrations (10 nM). Around 25% of the cells survived at higher concentrations (50 nM), however. When cells were treated with a

combination of cisplatin and bafilomycin, cytotoxicity was enhanced.¹⁰⁰

In short, V-ATPases are a potential target for increasing tumor sensitivity to drugs.¹⁰⁵

Conclusions and perspectives

Despite the multitude of V-ATPase inhibitor molecules, it appears that actual usefulness in clinical practice is still debated. The mechanism of action of some of these substances is not completely understood; hence, their use in humans should be restricted.

We believe that the future of these molecules in cancer treatment involves measuring the overexpression of specific V-ATPase subunits in tumors to be treated and then using inhibitors specific for the subunits being expressed,¹⁰⁴ as well as using several substances (e.g., RTA 203 and taxol) in a synergistic approach.¹⁰⁶ This will allow clinicians to provide more specific treatment, while also minimizing adverse effects.

Conflict of interest statement

None declared.

References

1. Forgac M. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *FEBS Lett* 1998;**440**(3):258–63.
2. Nishi T, Forgac M. The vacuolar (H⁺)-ATPases – nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;**3**(2):94–103.
3. Kawasaki-Nishi S, Nishi T, Forgac M. Proton translocation driven by ATP hydrolysis in V-ATPases. *FEBS Lett* 2003;**545**(1):76–85.
4. Finbow ME, Harrison MA. The vacuolar H⁺-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochem J* 1997;**324**(Pt 3):697–712.
5. Kane PM. Introduction: V-ATPases. *J Bioenerg Biomembr* 1999;**1**(3–5):1992–8.
6. Stevens TH, Forgac M. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;**13**:779–808.
7. Moriyama Y, Nelson N. H⁺-translocating ATPase in Golgi apparatus. Characterization as vacuolar H⁺-ATPase and its subunit structures. *J Biol Chem* 1989;**264**(31):18445–50.
8. Schoonderwoert VTG, Holthuis JCM, Tanaka S, Tooze SA, Martens GJM. Inhibition of the vacuolar H⁺-ATPase perturbs the transport, sorting, processing and release of regulated secretory proteins. *Eur J Biochem* 2000;**267**(17):5646–54.
9. Martinez-Zaguilan R, Lynch RM, Martinez GM, Gillies RJ. Vacuolar-type H⁺-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 1993;**265**(4):C1015–29.
10. Fais S, De Milito A, You H, Qin W. Targeting vacuolar H⁺-ATPases as a new strategy against cancer. *Cancer Res* 2007;**67**(22):10627–30.
11. Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;**85**(21):7972–6.
12. Moriyama Y, Nelson N. Inhibition of vacuolar H⁺-ATPases by fusidic acid and suramin. *FEBS Lett* 1988;**234**(2):383–6.
13. Erickson KL, Beutler JA, Cardellina II JH, Boyd MR. Salicylilalamides A and B, novel cytotoxic macrolides from the marine sponge *Haliclona* sp.. *J Org Chem* 1997;**62**(23):8188–92.
14. Galinis DL, McKee TC, Pannell LK, Cardellina JH, Boyd MR. Lobatamides A and B, novel cytotoxic macrolides from the Tunicate *Aplidium lobatum*. *J Org Chem* 1997;**62**(26):8968–9.
15. Kunze B, Janse R, Sasse F, Höfle G, Reichenbach H. Apicularens A and B, New cytotoxic macrolides from *Chondromyces* species (Myxobacteria): production, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot Tokyo* 1998;**51**(12):1075–80.
16. Gagliardi S, Nadler G, Consolandi E, Parini C, Morvan M, Legave MN, et al. 4-Pentadienamides: novel and selective inhibitors of the vacuolar H⁺-ATPase of osteoclasts with bone antiresorptive activity. *J Med Chem* 1998;**41**(10):1568–73.
17. Nadler G, Morvan M, Delimoge I, Belfiore P, Zocchetti A, James I, et al. (2Z,4E)-5-(5,6-dichloro-2-indolyl)-2-methoxy-N-(1,2,2,6,6-pentamethylpiperidin-4-yl)-2,4-pentadienamide, a novel, potent and selective inhibitor of the osteoclast V-ATPase. *Bioorg Med Chem Lett* 1998;**8**(24):3621–6.
18. Kim JW, Shin-Ya K, Furihata K, Hayakawa Y, Seto H. Oximidines I and II: novel antitumor macrolides from *Pseudomonas* sp.. *J Org Chem* 1999;**64**(1):153–5.
19. Sasse F, Steinmetz H, Hofle G, Reichenbach H. Archazolid, new cytotoxic macrolactones from *Archangium gephyra* (Myxobacteria). Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot Tokyo* 2003;**56**(6):520–5.

20. Shen R, Lin CT, Bowman EJ, Bowman BJ, Porco Jr JA. Lobatamide C: total synthesis, stereochemical assignment, preparation of simplified analogues, and V-ATPase inhibition studies. *J Am Chem Soc* 2003;**125**(26):7889–901.
21. Kunze B, Steinmetz H, Hofle G, Huss M, Wieczorek H, Reichenbach H. Cruentaren, a new antifungal salicylate-type macrolide from *Byssosvorax cruenta* (myxobacteria) with inhibitory effect on mitochondrial ATPase activity. Fermentation and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* 2006;**59**(10):664–8.
22. Petrangolini G, Supino R, Pratesi G, Bo LD, Tortoreto M, Croce AC, et al. Effect of a novel vacuolar-H⁺ATPase inhibitor on cell and tumor response to camptothecins. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;**318**(3):939–46.
23. Saroussi S, Nelson N. Vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase—an enzyme for all seasons. *Pflugers Arch*.
24. Niikura K. Effect of a V-ATPase inhibitor, FR202126, in syngeneic mouse model of experimental bone metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007;**60**(4):555–62.
25. Hesselink RW, Fedorov A, Hemminga MA, Prieto M. Membrane-bound peptides from V-ATPase subunit a do not interact with an indole-type inhibitor. *J Pept Sci* 2008;**14**(4):383–8.
26. Forgac M. Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiol Rev* 1989;**69**(3):765–96.
27. Finbow ME, Eliopoulos EE, Jackson PJ, Kenn JN, Meagher L, Thompson P, et al. *Protein Eng*(1):7–15.
28. Zhang K, Wang ZQ, Gluck S. Identification and partial purification of a cytosolic activator of vacuolar H⁽⁺⁾-ATPases from mammalian kidney. *J Biol Chem* 1992;**267**(14):9701–5.
29. Zhang K, Wang ZQ, Gluck S. A cytosolic inhibitor of vacuolar H⁽⁺⁾-ATPases from mammalian kidney. *J Biol Chem* 1992;**267**(21):14539–42.
30. Drose S, Altendorf K. Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J Exp Biol* 1997;**200**(Pt 1):1–8.
31. Muroi M, Shiragami N, Takatsuki A, Destruxin B, a specific and readily reversible inhibitor of vacuolar-type H⁽⁺⁾-translocating ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;**205**(2):1358–65.
32. Kataoka T, Muroi M, Ohkuma S, Waritani T, Magae J, Takatsuki A, et al. Prodigiosin 25-C uncouples vacuolar type H⁽⁺⁾-ATPase, inhibits vacuolar acidification and affects glycoprotein processing. *FEBS Lett* 1995;**359**(1):53–9.
33. Cantrell CL, Gustafson KR, Cecere MR, Pennell LK, Boyd MR. Chondropsins A and B: novel tumor cell growth-inhibitory macrolide lactams from the marine sponge *Chondropsis* sp.. *J Am Chem Soc* 2000;**122**(37):8825–9.
34. Sorensen MG, Henriksen K, Neutsky-Wulff AV, Dziegiel MH, Karsdal MA. Diphyllin, a novel and naturally potent V-ATPase inhibitor, abrogates acidification of the osteoclastic resorption lacunae and bone resorption. *J Bone Miner Res* 2007;**22**(10):1640–8.
35. Zhang J, Feng Y, Forgac M. Proton conduction and bafilomycin binding by the V₀ domain of the coated vesicle V-ATPase. *J Biol Chem* 1994;**269**(38):23518–23.
36. Bowman BJ, Bowman EJ. Mutations in subunit C of the vacuolar ATPase confer resistance to bafilomycin and identify a conserved antibiotic binding site. *J Biol Chem* 2002;**277**(6):3965–72.
37. Huss M, Ingenhorst G, König S, Gassel M, Drose S, Zecek A, et al. Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V₀ subunit c. *J Biol Chem* 2002;**277**(43):40544–8.
38. Fernandes F, Loura LM, Fedorov A, Dixon N, Kee TP, Prieto M, et al. Binding assays of inhibitors towards selected V-ATPase domains. *Biochim Biophys Acta* 2006;**1758**(11):1777–86.
39. Bowman BJ, McCall ME, Baertsch R, Bowman EJ. A model for the proteolipid ring and bafilomycin/concanamycin-binding site in the vacuolar ATPase of *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 2006;**281**(42):31885–93.
40. Murata T, Kawano M, Igarashi K, Yamato I, Kakinuma Y. Catalytic properties of Na⁽⁺⁾-translocating V-ATPase in *Enterococcus hirae*. *Biochim Biophys Acta* 2001;**1505**(1):75–81.
41. Bowman EJ, Graham LA, Stevens TH, Bowman BJ. The bafilomycin/concanamycin binding site in subunit c of the V-ATPases from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2004;**279**(32):33131–8.
42. Bowman EJ, Bowman BJ. Cellular role of the V-ATPase in *Neurospora crassa*: analysis of mutants resistant to concanamycin or lacking the catalytic subunit A. *J Exp Biol* 2000;**203**(Pt 1):97–106.
43. Teplova VV, Tonshin AA, Grigoriev PA, Saris NE, Salkinoja-Salonen MS. Bafilomycin A1 is a potassium ionophore that impairs mitochondrial functions. *J Bioenerg Biomembr* 2007;**39**(4):321–9.
44. Scheidt KA, Bannister TD, Tasaka A, Wendt MD, Savall BM, Fegley GJ, et al. Total synthesis of (–)-Bafilomycin A1. *J Am Chem Soc* 2002;**124**(24):6981–90.
45. Boyd MR, Farina C, Belfiore P, Gagliardi S, Kim JW, Hayakawa Y, et al. Discovery of a novel antitumor benzolactone enamide class that selectively inhibits mammalian vacuolar-type (H⁺)-atpases. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;**297**(1):114–20.
46. Bowman EJ, Bowman BJ. V-ATPases as drug targets. *J Bioenerg Biomembr* 2005;**37**(6):431–5.
47. Wu Y, Liao X, Wang R, Xie XS, De Brabander JK. Total synthesis and initial structure–function analysis of the potent V-ATPase inhibitors salicylhalamide A and related compounds. *J Am Chem Soc* 2002;**124**(13):3245–53.
48. Sugimoto Y, Konoki K, Murata M, Matsushita M, Kanazawa H, Oishi T. Design, synthesis, and biological evaluation of fluorinated analogues of salicylhalamide. *J Med Chem* 2009;**52**(3):798–806.
49. Lebreton S, Jaunbergs J, Roth MG, Ferguson DA, De Brabander JK. Evaluating the potential of Vacuolar ATPase inhibitors as anticancer agents and multigram synthesis of the potent salicylhalamide analog saliphenylhalamide. *Bioorg Med Chem Lett* 2008;**18**(22):5879–83.
50. Huss M, Sasse F, Kunze B, Jansen R, Steinmetz H, Ingenhorst G, et al. Archazolid and apicaren: novel specific V-ATPase inhibitors. *BMC Biochem* 2005;**6**:13.
51. Shen R, Lin CT, Bowman EJ, Bowman BJ, Porco Jr JA. Synthesis and V-ATPase inhibition of simplified lobatamide analogues. *Org Lett* 2002;**4**(18):3103–6.
52. Kunze B, Sasse F, Wiecek H, Huss M, Cruentaren A. A highly cytotoxic benzolactone from Myxobacteria is a novel selective inhibitor of mitochondrial F1-ATPases. *FEBS Lett* 2007;**581**(18):3523–7.
53. Menche D, Hassfeld J, Sasse F, Huss M, Wiecek H. Design, synthesis, and biological evaluation of novel analogues of archazolid: a highly potent simplified V-ATPase inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* 2007;**17**(6):1732–5.
54. Roethle PA, Chen IT, D Trauner. Total synthesis of (–)-archazolid B. *J Am Chem Soc* 2007;**129**(29):8960–1.
55. Hassfeld J, Fares C, Steinmetz H, Carlomagno T, Menche D. Stereochemical determination of Archazolid A and B, highly potent vacuolar-type ATPase inhibitors from the Myxobacterium *Archangium gephyra*. *Org Lett* 2006;**8**(21):4751–4.
56. Dixon N, Pali T, Kee TP, Ball S, Harrison MA, Findlay JB, et al. Interaction of spin-labeled inhibitors of the vacuolar H⁺ATPase with the transmembrane Vo-sector. *Biophys J* 2008;**94**(2):506–14.
57. Pali T, Whyteside G, Dixon N, Kee TP, Ball S, Harrison MA, et al. Interaction of inhibitors of the vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase with the transmembrane Vo-sector. *Biochemistry* 2004;**43**(38):12297–305.
58. Supino R, Petrangolini G, Pratesi G, Tortoreto M, Favini E, Bo LD, et al. Antimetastatic effect of a small-molecule vacuolar H⁺ATPase inhibitor in vitro and in vivo preclinical studies. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;**324**(1):15–22.
59. Dell'Antone P. Inactivation of H⁺vacuolar ATPase by the energy blocker 3-bromopyruvate: a new antitumor agent. *Life Sci* 2006;**79**(21):2049–55.
60. Takeda M, Suno-Ikeda C, Shimabukuro K, Yoshida M, Yokoyama K. Mechanism of inhibition of the V-type molecular motor by tributyltin chloride. *Biophys J* 2009;**96**(3):1210–7.
61. Niikura K, Nakajima S, Takano M, Yamazaki H. FR177995, a novel vacuolar ATPase inhibitor, exerts not only an inhibitory effect on bone destruction but also anti-immunoinflammatory effects in adjuvant-induced arthritic rats. *Bone*(4):888–94.
62. Niikura K, Takano M, Sawada M. A novel inhibitor of vacuolar ATPase, FR167356, which can discriminate between osteoclast vacuolar ATPase and lysosomal vacuolar ATPase. *Br J Pharmacol* 2004;**142**(3):558–66.
63. McLean LA, Roscoe J, Jorgensen NK, Gorin FA, Cala PM. Malignant gliomas display altered pH regulation by NHE1 compared with nontransformed astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;**278**(4):C676–888.
64. Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ. The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer* 2005;**5**(10):786–95.
65. Perona R, Serrano R. Increased pH and tumorigenicity of fibroblasts expressing a yeast proton pump. *Nature* 1988;**334**(6181):438–40.
66. Sennoune SR, Martinez-Zaguilan R. Plasmalemmal vacuolar H⁺ATPases in angiogenesis diabetes and cancer. *J Bioenerg Biomembr* 2007;**39**(5–6):427–33.
67. Montcourrier P, Silver I, Farnoud R, Bird I, Rochefort H. Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism. *Clin Exp Metastasis* 1997;**15**(4):382–92.
68. Parkins CS, Stratford MR, Dennis MF, Stubbs M, Chaplin DJ. The relationship between extracellular lactate and tumour pH in a murine tumour model of ischaemia-reperfusion. *Br J Cancer* 1997;**75**(3):319–23.
69. Martinez-Zaguilan R, Seftor EA, Seftor RE, Chu YW, Gillies RJ, Hendrix MJ. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 1996;**14**(2):176–86.
70. Rofstad EK, Mathiesen B, Kindem K, Galappathi K. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res* 2006;**66**(13):6699–707.
71. Montcourrier P, Mangeat PH, Valembois C, Salazar G, Sahuquet A, Duperray C, et al. Characterization of very acidic phagosomes in breast cancer cells and their association with invasion. *J Cell Sci* 1994;**107**(Pt 9):2381–91.
72. Rozhin J, Sameni M, Ziegler G, Sloane BF. Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Res* 1994;**54**(24):6517–25.
73. Johnson LL, Pavlovsky AG, Johnson AR, Janowicz JA, Man CF, Ortwine DF, et al. A rationalization of the acidic pH dependence for stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) catalysis and inhibition. *J Biol Chem* 2000;**275**(15):11026–33.
74. Kato Y, Lambert CA, Colige AC, Mineur P, Noel A, Franken F, et al. Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 2005;**280**(12):10938–44.
75. Gocheva V, Joyce JA. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle* 2007;**6**(1):60–4.
76. Sennoune SR, Bakunts K, Martinez GM, Chua-Tuan JL, Kebir Y, Attaya MN, et al. Vacuolar H⁺ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;**286**(6):C1443–52.
77. Lu X, Qin W, Li J, Tan N, Pan D, Zhang H, et al. The Growth and Metastasis of Human Hepatocellular Carcinoma Xenografts Are Inhibited by Small Interfering RNA Targeting to the Subunit ATP6L of Proton Pump. *Cancer Res* 2005;**65**(15):6843–9.

78. Halaban R, Patton RS, Cheng E, Svedine S, Trombetta ES, Wahl ML, et al. Abnormal acidification of melanoma cells induces tyrosinase retention in the early secretory pathway. *J Biol Chem* 2002;**277**(17):14821–8.
79. Nanda A, Brumell JH, Nordstrom T, Kjeldsen L, Sengelov H, Borregaard N, et al. Activation of proton pumping in human neutrophils occurs by exocytosis of vesicles bearing vacuolar-type H⁺ATPases. *J Biol Chem* 1996;**271**(27):15963–70.
80. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004;**4**(11):891–9.
81. Volk C, Albert T, Kempinski OS. A proton-translocating H⁺ATPase is involved in C6 glial pH regulation. *Biochim Biophys Acta* 1998;**1372**(1):28–36.
82. McSheehy PM, Troy H, Kelland LR, Judson IR, Leach MO, Griffiths JR. Increased tumour extracellular pH induced by Bafilomycin A1 inhibits tumour growth and mitosis in vivo and alters 5-fluorouracil pharmacokinetics. *Eur J Cancer* 2003;**39**(4):532–40.
83. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, DA Hilton, Zagzag D, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999;**59**(22):5830–5.
84. Lim JH, Park JW, Kim MS, Park SK, Johnson RS, Chun YS. Bafilomycin induces the p21-mediated growth inhibition of cancer cells under hypoxic conditions by expressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol Pharmacol* 2006;**70**(6):1856–65.
85. Ohta T, Arakawa H, Futagami F, Fushida S, Kitagawa H, Kayahara M, et al. Bafilomycin A1 induces apoptosis in the human pancreatic cancer cell line Capan-1. *J Pathol* 1998;**185**(3):324–30.
86. Aiko K, Tsujisawa T, Koseki T, Hashimoto S, Morimoto Y, Amagasa T, et al. Involvement of cytochrome c and caspases in apoptotic cell death of human submandibular gland ductal cells induced by concanamycin A. *Cell Signal* 2002;**14**(8):717–22.
87. De Milito A, Iessi E, Logozzi M, Lozupone F, Spada M, Marino ML, et al. Proton pump inhibitors induce apoptosis of human B-cell tumors through a caspase-independent mechanism involving reactive oxygen species. *Cancer Res* 2007;**67**(11):5408–17.
88. Gottlieb RA, Giesing HA, Zhu JY, Engler RL, Babior BM. Cell acidification in apoptosis: granulocyte colony-stimulating factor delays programmed cell death in neutrophils by up-regulating the vacuolar H⁺(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;**92**(13):5965–8.
89. Xu J, Feng HT, Wang C, Yip KH, Pavlos N, Papadimitriou JM, et al. Effects of Bafilomycin A1: an inhibitor of vacuolar H⁺(+)-ATPases on endocytosis and apoptosis in RAW cells and RAW cell-derived osteoclasts. *J Cell Biochem* 2003;**88**(6):1256–64.
90. Morimura T, Fujita K, Akita M, Nagashima M, Satomi A. The proton pump inhibitor inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoblastoma. *Pediatr Surg Int* 2008;**24**(10):1087–94.
91. Nakashima S, Hiraku Y, Tada-Oikawa S, Hishita T, Gabazza EC, Tamaki S, et al. Vacuolar H⁺ATPase inhibitor induces apoptosis via lysosomal dysfunction in the human gastric cancer cell line MKN-1. *J Biochem* 2003;**134**(3):359–64.
92. Hishita T, Tada-Oikawa S, Tohyama K, Miura Y, Nishihara T, Tohyama Y, et al. Caspase-3 activation by lysosomal enzymes in cytochrome c-independent apoptosis in myelodysplastic syndrome-derived cell line P39. *Cancer Res* 2001;**61**(7):2878–84.
93. Wu YC, Wu WKK, Li Y, Yu L, Li ZJ, Wong CCM, et al. Inhibition of macroautophagy by bafilomycin A1 lowers proliferation and induces apoptosis in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;**382**(2):451–6.
94. Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;**36**(12):2445–62.
95. Mortimore GE, Hutson NJ, Surmacz CA. Quantitative correlation between proteolysis and macro- and microautophagy in mouse hepatocytes during starvation and refeeding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;**80**(8):2179–83.
96. Martinez-Munoz GA, Kane P. Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *J Biol Chem* 2008;**283**(29):20309–19.
97. Lyons JC, Kim GE, Song CW. Modification of intracellular pH and thermosensitivity. *Radiat Res* 1992;**129**(1):79–87.
98. Hayashi Y, Katayama K, Togawa T, Kimura T, Yamaguchi A. Effects of bafilomycin A1 a vacuolar type H⁺ ATPase inhibitor on the thermosensitivity of a human pancreatic cancer cell line. *Int J Hyperthermia* 2006;**22**(4):275–85.
99. Ohta T, Arakawa H, Futagami F, Fushida S, Kitagawa H, Kayahara M, et al. A new strategy for the therapy of pancreatic cancer by proton pump inhibitor. *Gan To Kagaku Ryoho*(12):1660–4.
100. Murakami T, Shibuya I, Ise T, Chen ZS, Akiyama S, Nakagawa M, et al. Elevated expression of vacuolar proton pump genes and cellular PH in cisplatin resistance. *Int J Cancer* 2001;**93**(6):869–74.
101. Torigoe T, Izumi H, Ise T, Murakami T, Uramoto H, Ishiguchi H, et al. Vacuolar H⁺(+)-ATPase: functional mechanisms and potential as a target for cancer chemotherapy. *Anticancer Drugs*(3):237–43.
102. Torigoe T, Izumi H, Ishiguchi H, Uramoto H, Murakami T, Ise T, et al. Enhanced expression of the human vacuolar H⁺ATPase c subunit gene (ATP6L) in response to anticancer agents. *J Biol Chem* 2002;**277**(39):36534–43.
103. Sennoun SR, Luo D, Martinez-Zaguilan R. Plasmalemmal vacuolar-type H⁺ATPase in cancer biology. *Cell Biochem Biophys* 2004;**40**(2):185–206.
104. Perez-Sayans M, Garcia-Garcia A, Reboiras-Lopez MD, Gandara-Vila P. Role of V-ATPases in solid tumors: Importance of the subunit C (Review). *Int J Oncol* 2009;**34**(6):1513–20.
105. Hinton A, Bond S, Forgac M. V-ATPase functions in normal and disease processes. *Pflugers Arch* 2009;**457**(3):589–98.
106. Hilgenbrink AR, Low PS. Folate receptor-mediated drug targeting: from therapeutics to diagnostics. *J Pharm Sci* 2005;**94**(10):2135–46.
107. Huss M, Wieczorek H. Inhibitors of V-ATPases: old and new players. *J Exp Biol* 2009;**212**(Pt 3):341–6.

Role of V-ATPases in solid tumors: Importance of the subunit C (Review)

MARIO PÉREZ-SAYÁNS, ABEL GARCÍA-GARCÍA,
MARÍA DOLORES REBOIRAS-LÓPEZ and PILAR GÁNDARA-VILA

Facultad de Odontología, Entreríos s/n, Santiago de Compostela, C.P. 15782, Spain

Received December 5, 2008; Accepted January 15, 2009

DOI: 10.3892/ijo_00000280

Abstract. Acidity is one of the main characteristics of OSCC (oral squamous cell carcinoma) as a solid tumor. The V-ATPase is the primary regulator of the tumor micro-environment, by means of proton extrusion to the extracellular medium. The decrease in extracellular pH confers the cells a resistant, highly invasive and metastatic phenotype. However, the acid medium confers an optimum pH to the degradative enzymes (such as proteases and MMPs) for their proper functioning. The C subunit (ATP6V1C) of V1 intra-membrane domain of the V-ATPase, is primarily responsible for its enzymatic function, through the control of a reversible dissociation of V0 and V1 domains. In this review, we describe the importance of V-ATPases in the control of tumor micro-environment, the potential strategies as protein targeting to improve the effectiveness of drug treatment and the role of the C subunit as the primarily responsible of the enzymatic control. The inhibition of the V-ATPase activity through PPIs (proton inhibitors) seems to reduce the destructive and metastatic capacity in tumors, such as hepatocellular carcinoma. Nevertheless, none of these inhibitors was proven to be useful in OSCC; therefore, it is highly important to carry out further studies in order to develop specific inhibitors of the C subunit, to control the devastating effects of OSCC.

Contents

1. Introduction
2. Role of V-ATPases in oral cancer
3. V-ATPases as protein targeting
4. Importance of C subunit
5. Conclusions

Correspondence to: Dr Mario Pérez-Sayáns, Facultad de Odontología, Entreríos s/n, Santiago de Compostela, C.P. 15782, Spain
E-mail: perezsayans@gmail.com

Key words: oral squamous cell carcinoma, V-ATPase

1. Introduction

The main characteristics of the solid tumors (such as oral cancer) are the acidity and hypoxia, phenomena that result from the progression of metastatic cancer (1), the sensitivity to chemotherapeutic agents (2) and proliferation (3). In fact, a mechanism of resistance to cytotoxic drugs is the alteration of the pH gradient between the extracellular environment and cell cytoplasm (4).

The cytosolic pH seems to be strictly regulated by four mechanisms: the family of sodium-proton exchangers (NHE), the family of bicarbonate transporters (BCT), the family of monocarboxylate transporters (MCT) and the proton pumps (ATPase) (5,6) (Fig. 1). The lactate production has been commonly seen as the first acidification mechanism of the microenvironment (7). The lactate accumulation results in the activation of the aerobic glycolytic metabolism (8) which increases the amount of cellular lactate that is transported outside the cell through the H⁺/lactate co-transporter (MCT) (9). The increase in aerobic glycolysis (8,10) provides to the tumor a metabolic environment characterized by low levels of serum, hypoxia and an acid extracellular pH. This micro-environment increases the invasive ability of the tumor and the expression of growth and angiogenic factors/receptors (11). All this is correlated to an increment of the intracellular pH, an aggravation of the initial development of the interstitial acid microenvironment and a reversed transmembrane pH gradient (11,12). This increase in the intracellular pH is concomitant with an increment of DNA synthesis (8,13,14), cell cycle progression (15-17), serum and substrate-independent growth (8) and the *in vivo* growth of the tumor (8,18) and all these phenomena trigger a pathological and disorganized increase in density and cell number. However, tumors are able to create an acidic environment even in conditions of reduced production of lactate, suggesting that the aerobic metabolism is not the major mechanism responsible for the development of an acidic microenvironment within solid tumors such as oral squamous cell carcinoma (OSCC) (19,20). On the one hand, the same favourable conditions are maintained for the tumor cells, and on the other hand the selection of highly malignant cancer cells (which can survive in a hostile environment) is facilitated (21).

To survive in this microenvironment, tumor cells must have a regulatory system of cytosolic pH that assists cells in defending themselves against the dangerous H⁺ ions. This

could explain the fact that the V-ATPases, which normally reside in acidic organelles may be also located at the cell surface, regulating the pH and exacerbating the migratory ability of metastatic cells (22,23).

2. Role of V-ATPases in oral cancer

The cell transformation and carcinogenesis processes are accompanied by metabolic disorders, increased production of protons, acidification of the extracellular environment and alkalization of the cytoplasm (24-26). Therefore, the development and maintenance of this gradient is due directly to the ability of tumor cells to secrete protons (H^+), acidify the extracellular environment (11,12,26) and maintain an alkaline cytosolic pH (27). In addition, this ability is increased with the aggressiveness of the tumor (28,29).

Immunohistochemical data show that the V-ATPase is located in the plasma membrane of breast (23,24) and lung (30) cancer cells; this occurs prominently in the highly metastatic cells and with less intensity in the lowly metastatic cells (23,24). Otero-Rey *et al* demonstrate the ATP6V1C1 overexpression in OSCC, one of the most significant subunit of the V-ATPases (31).

According to Martínez-Zaguilán *et al* (24) the V-ATPase expression in the plasma membrane is due to some kind of dysfunction of the normal constituents of the cell. These constituents include the cytoskeleton (32), leader sequences (33) or alterations in a chaperone (34). To Sennoune *et al* the changes in cytosolic pH have multiple phenotypic expression, but according to the authors, the alteration of a single protein (the V-ATPase in the plasma membrane) is responsible for the dysfunctions in protein and cellular pathways of cancer (27).

The acid component of the intratumoral metabolic micro-environment increases the metastatic potential by promoting the angiogenesis (27,35), the anchorage-independent growth, the genetic instability (7) and the invasion, infiltration and penetration of cancer cells into the normal tissue (11).

Martínez-Zaguilán *et al* found that microvascular endothelial cells with the highest migratory capacity express V-ATPases in the plasma membrane. The treatment of these cells with inhibitors of V-ATPases reduces the proton flux, via inhibition of V-ATPase in the plasma membrane (pmV-ATPases) and cell migration, suggesting that they are essential for the regulation of cytosolic pH and migration of endothelial cells (36).

The proton flux, via V-ATPase, evaluated by fluorescence spectroscopy in living cells, was greater in highly than in lowly metastatic cells. Curiously, the lowly metastatic cells use preferably Na^+/H^+ and HCO_3^- transporters, while highly metastatic cells use V-ATPases. Moreover, these latter cells are more invasive and migratory than the former. These data indicate that the pmV-ATPases are involved in the acquisition of a more metastatic phenotype (37).

The V-ATPases play an important role in the development of tumor metastasis, as previously said. Many tumor cells secrete lysosomal enzymes, involved in the degradation of the extracellular matrix, required for metastatic invasion. These enzymes have a low optimum pH and the V-ATPases are the only responsible for the microenvironment acidification (24,38).

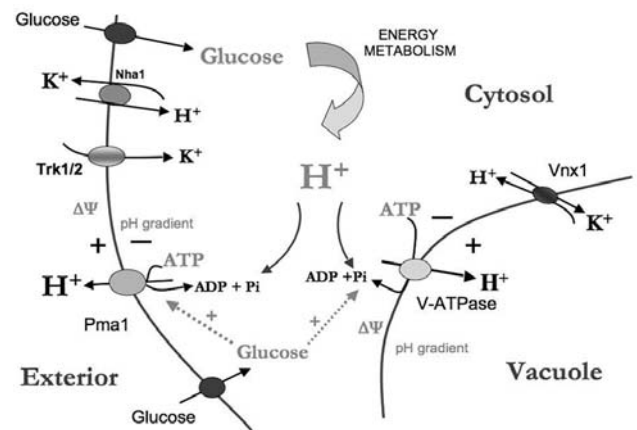


Figure 1. Role of the V-ATPase in the control of intra and extracellular pH. Obtained from Martínez Muñoz and Kane (76).

The motility and invasive phenotype are the requirements that make the cell responsible for metastasis (11,27).

The treatment with V-ATPase inhibitors (such as Bafilomycin A1 and Concanamycin A) inhibits the enzyme activity as well as the migratory ability of highly metastatic cells (23,30). It has been shown that the greatest increase in the invasiveness of tumor cells is the result of two complementary mechanisms: breaking of the cell-matrix interactions that arise because of the acid secretion increment, the protease activity (such as Cathepsin B) and the increased cell motility (11,23,30). The breast cancer cells, through V-ATPases, acidify the extracellular environment in order to facilitate the reabsorption of the extracellular matrix by means of proteases and metastasis (28).

Cell pH is crucial for several biological functions such as cell proliferation, invasion and metastasis, drug resistance and apoptosis. The hypoxic conditions are frequent phenomena during the OSCC development and they cause an intra- and extracellular acidosis. This cellular acidosis seems to be a trigger for apoptosis and allows the endonuclease activation that induces DNA fragmentation. The pH regulators should be over-regulated in the tumor cells in order to avoid intracellular acidification under the above-mentioned conditions (31).

As already mentioned, the tumor microenvironment is essential for the neoplastic progression and the reduction of extracellular pH is one of this microenvironment features. Since V-ATPase is the main proton pump regulator of the cell pH, its involvement in the neoplastic progression should not surprise anyone.

3. V-ATPases as protein targeting

Growing scientific evidence suggests a key role of tumor acidic microenvironment in cancer development, in terms of progression and metastasis. Among all regulatory mechanisms of tumor microenvironment, the V-ATPases play a key role due to their inhibition possibility by means of RNA interference techniques and inhibitors of proton pump (39).

Early attempts to block the V-ATPases as a protein targeting date back to 1988, when Moriyama *et al* described the inhibition of V-ATPase activity, through blocking the

Table I. Inhibitors of pH regulators.

A. V-ATPase inhibitors

Bafilomycin A1
 Concanamycin A (Folimycin)/B
 NEM: N-ethyl-maleimide
 NBD-Cl: 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole
 DCCD: N,N0-dicyclohexyl-carbodiimide
 Destruxin B
 Salicylilhalamide A
 Lobatamide
 Oximidine

B. NHE inhibitors

Guanidine derivatives

(i) Benzoylguanidine

Cariporide, HOE642: 4-isopropyl-3-methylsulphonylbenzoyl-guanidine methanesulphonate
 Hoe 694: 3-methylsulfonyl-4-piperidinobenzoyl, guanidine hydrochloride
 FR183998: 5-(2,5-dichlorothiophen-3-yl)-3-[(2-dimethylaminoethyl)carbamoyl]benzoylguanidine dihydrochloride
 FR168888: 5-hydroxymethyl-3-(pyrrol-1-yl) benzoylguanidine methanesulfonate
 EMD 85131: 2-methyl-5-methylsulfonyl-1-(1-pyrrollyl)-benzoylguanidine

(ii) Carbonylguanidine

Zoniporide or CP-597,396: [1-(Quinolin-5-yl)-5-cyclopropyl-1H-pyrazole-4-carbonyl]guanidine hydrochloride monohydrate
 TY-12533: 6,7,8,9-tetrahydro-2-methyl-5H-cyclohepta[b]pyridine-3-carbonylguanidine maleate
 CAS 181048-29-3, MS-31-050: 2-(2-methylphenyl)-5,7-dimethoxy-4-quinolyl carbonylguanidine dihydrochloride
 CAS 181048-36-2, MS-31-038: 2-phenyl-8-(2-methoxyethoxy)-4-quinolyl carbonylguanidine bismethanesulfonate
 KB-R9032: N-(4-isopropyl-2,2-dimethyl-3-oxo-3,4-dihydro-2H-benzo[1,4]oxazine-6-carbonyl)guanidine (4b) methanesulfonate salt

(iii) Others

T-162559: (5E,7S)-[7-(5-fluoro-2-methylphenyl)-4-methyl-7,8-dihydro-5(6H)-quinolinylideneamino] guanidine dimethanesulphonate

Amiloride derivatives

DMA: 50-(N,N-dimethyl)-amiloride
 HMA: 5-(N,N-hexamethylene) amiloride
 MIA: 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride

C. Bicarbonate transporter inhibitor

Triflocin: 4-(a,a,a-trifluoro-m-toluidino)-nicotinic acid
 DIDS: 4,40-diisothiocyanato-stilbene-2,20-disulfonic acid
 SITS: 4-acetamido-40;isothiocyanostilbene-2,20-disulfonic acid
 S3705

D. MCT inhibitors

DIDS: 4,40-diisothiocyanato-stilbene-2,20-disulfonic acid
 a-cyano-4-hydroxycinnamate (a-CHC)
 p-Chloromercuribenzenesulphonate
 Diethyl pyrocarbonate
 Quercetin

assembly and reducing H⁺ secretory activity, using fusidic acid and suramin (40).

In 2001, Boyd *et al* described a small group of molecules that share a common core of benzyl-lactate-enamide in their structure. These molecules are proton pump inhibitors (PPI) (Table I). The most representative are the following: *salicylamide A*, *lobatamides A-F*, *oxymidines I* and *II*, *bafilomycins* and *canamycins*. Of these, the authors found that the latter two are the most potent V-ATPase inhibitors and even that there is no distinction between mammalian

and non-mammalian V-ATPases. This inhibition causes a reduction in the development of tumor cells and cell lines with oncogenes (41) through programmed cell death (apoptosis) (42). The PPI effect is mediated by a very early production of reactive oxygen species (ROS) that preceded alkalinization of lysosomal pH, lysosomal membrane permeabilization, and cytosol acidification, suggesting an early destabilization of the acidic vesicular compartment. Lysosomal alterations were followed by mitochondrial membrane depolarization, release of cytochrome c, chromatin condensation, and caspase

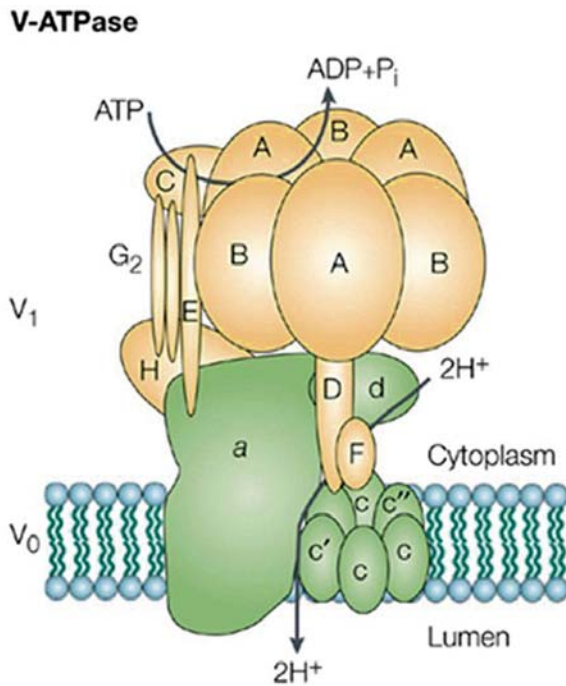


Figure 2. The cytosolic domain V1 (shown in yellow), is composed of three subunits A and three subunits B, two subunits G and one subunit of types C, D, E, F and H. The transmembrane domain V0 (shown in green) is composed of five different subunits: a, c, c', c'' and d. ATP hydrolysis by the peripheral V1 domain drives proton transport through the integral V0 domain from the cytoplasm to the lumen. Modified from Nishi and Forgac (37).

activation (43). It seems that the ROS have a clear effect on oral carcinogenesis (44).

Regarding B-cell lymphomas, the proapoptotic activity of PPI is clearly related to the inhibition of tumor growth (43).

Yoshimoto and Imoto show new roles of V-ATPase inhibitors in tumor cells that overexpress EGFR (epidermal growth factor receptor). The authors find that the V-ATPase inhibitors induce apoptosis in EGFR-stimulated A431 cells (human epidermal carcinoma) with the same dose range that inhibits the V-ATPase activity. However, when cells are not stimulated by EGFR, the inhibitors do not induce apoptosis, while they put a brake on cell growth, independently of the cell cycle (45).

The ATP6L or the C subunit of V0 domain has been determined in recent studies as a possible target in the suppression of metastasis and tumor growth via V-ATPase inhibition, aimed at altering the acid microenvironment of the extracellular matrix, which is necessary for the activity of many MMPs (metalloproteinases) and proteases (23,27,46,47).

Saroussi and Nelson (23) and Ohta *et al* (48) note that V-ATPase C subunit emerges as overexpressed in pancreatic invasive tumors when compared to benign or non-invasive tumors, suggesting that the V-ATPase may have a key role in tumor progression.

However, Otero-Rey *et al* find that ATP6V0C is not overexpressed in OSCC in a statistically significant way, so that blocking this gene does not seem to be very useful in this type of tumors (31).

Lu *et al* demonstrate the ability to slow tumor growth and to suppress distant metastasis in human hepatocellular

carcinoma, by the decrease of proton extrusion and the activity of the gelatinase, via inhibition of C subunit gene (ATP6L) by using RNA interference techniques (47).

It has been shown that the E5 oncoprotein of the bovine papillomavirus binds to the C subunit of V-ATPase V0 domain (49,50), triggering a Golgi alkalization that correlates with cell transformation induced by this protein (51); therefore, blocking the V-ATPase via inhibition of C subunit could suppress the carcinogenic effects of HPV.

It seems that Concanamycin A binds to the C subunit of the V0 (52) domain as well as the Bafilomycin (53). According to Bowman (75) the mutations in the genomic sequence of the C subunit (four mutations have been found: T32I, F136L, Y143H and Y143N) give the cell the ability to resist Bafilomycin A1.

There are other new specific inhibitors of the V-ATPases, which are already synthesized in the laboratory as the analogues of archazolid A and B (54). The use of the novel NiK12192 V-ATPase inhibitor increases the anti-tumor activity of other chemotherapeutic drugs (23,55). Another study shows the efficacy of FR202126 (a specific V-ATPase inhibitor of osteoclasts) in decreasing the osteolysis in the lung cancer metastasis (56).

However, it seems that none of these inhibitors has been proven useful in the OSCC, so that it is of high importance to carry out further research in order to determine the actual implication of V-ATPases in cancer development and implementation of other inhibitors in the subunits responsible for enzyme assembly (23).

4. Importance of C subunit

V-ATPase is composed of a cytosolic V1 domain and a transmembrane V0 domain. The V1 domain consists of three A and three B subunits, two G subunits as well as a C, D, E, F and H subunit. C subunit is analogue but not homologous to the subunit γ of F-ATPases (Fig. 2). Two alternative transcript variants, ATP6V1C1 and ATP6V1C2, a and b, that encode different isoforms, have been found for this gene. Regarding the ATP6V1C1, it is always expressed in all tissues, while ATP6V1C2a, b are found in lungs, kidneys and epididymis with an actin-binding function (57).

The C subunit is the 40-kDa protein, located in the V1 domain of the V-ATPase. The novel imaging techniques such as SAXS (small angle X-ray scattering) allow describing the structure and morphology of the C subunit and its involvement in the regulation of V-ATPases (58,59).

By means of immune electronic microscopy, we can determine the spatial location and distribution of the various subunits, in this case of the C subunit (60,61). The model proposed by Zhang *et al* coincides with the one proposed by Drory *et al* which stipulates that the crystal structure of the C subunit consists of two globular domains connected by a flexible connection (62) (Fig. 3).

Inoue and Forgac, besides establishing the crystal structure of the C subunit and its importance in the reversible dissociation as a mechanism for monitoring the V-ATPase activity, describe the connection of the latter with the G and E subunit of the V1 domain and the A subunit of the V0 domain, establishing the importance of the C subunit as the highest responsible for the enzyme control (63,64).

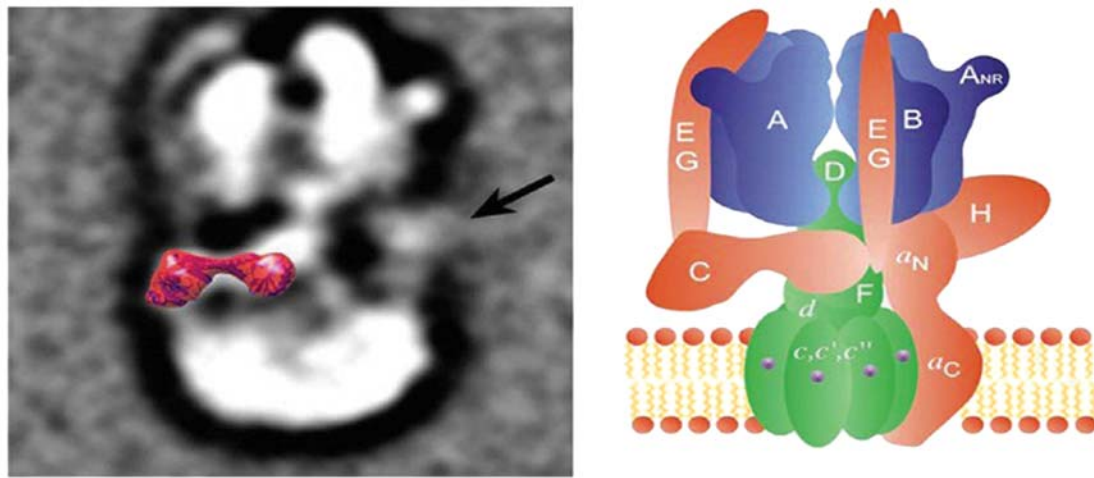


Figure 3. Image of the crystallographic structure of the C subunit and schematic work model. (A) The surface representation of the crystal structure of yeast subunit C is superimposed to match the observed density in the yeast V-ATPase projection. (B) Schematic working model of the subunit arrangement in the yeast V-ATPase. Modified from Zhang *et al* (60).

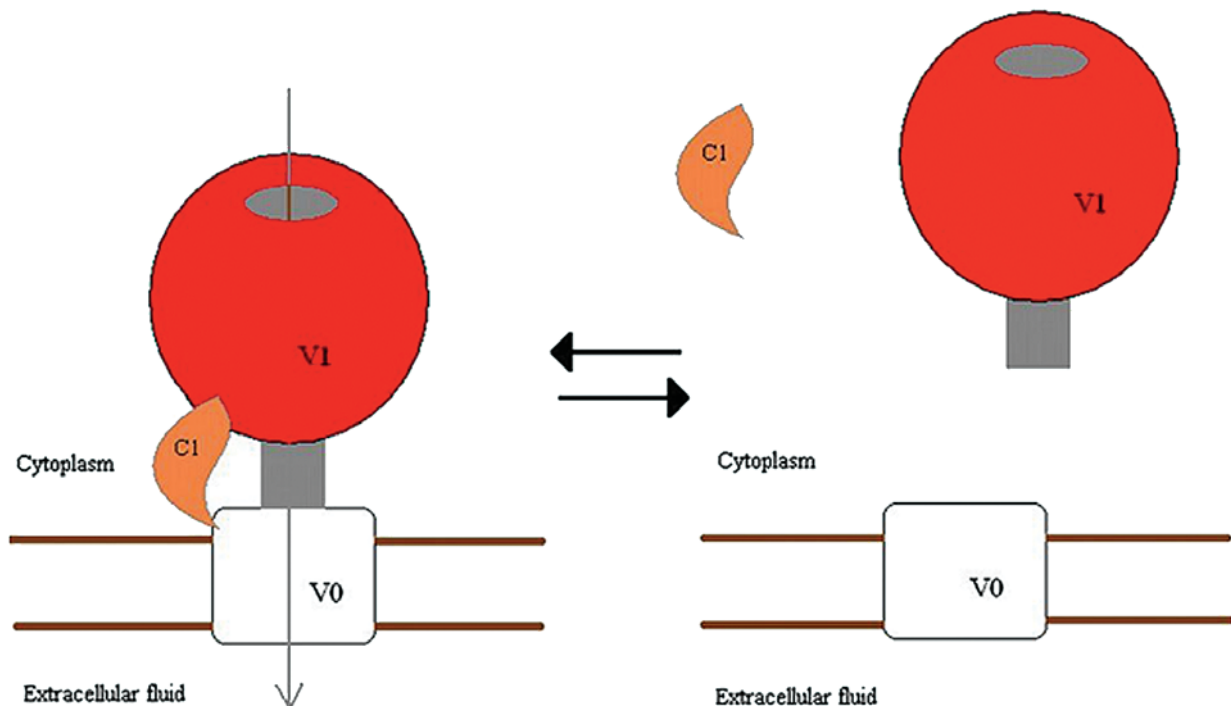


Figure 4. Structural model of the vacuolar H⁺-ATPase, comprising a membrane component (V0) and a catalytic cytosolic component (V1). Dissociation of the V-ATPase into the V1 and V0 components is regulated by the C1 subunit. Obtained from Otero-Rey (31).

In an experimental model, Peng *et al* show that the C subunit is crucial to proton secretion function of the V-ATPases, since the ATP hydrolysis is blocked without it (65).

To many authors, the most important function of the subunit C is the control of reversible dissociation. According to Grüber *et al* subunit C is intimately involved in the reversible dissociation of the V0 and V1 domains. The nucleotide occupation of this latter and the conformational change in its structure allow such a dissociation (66,67).

At first, Puopolo *et al* assert that during the formation of the complex V1V0, subunit C speeds up the process but it is not essential (68), although these results are discussed in other studies of the same period of time, that defend the hypothesis

of the C subunit as the only regulatory of the dissociative mechanism (69). This theory is supported by Drory *et al* who state that the C subunit is the only responsible for the *in vivo* dissociation of the V-ATPase (62). According to Voss *et al* the C subunit is responsible for producing the dissociation of the V-ATPase in the cytosolic V1 complex and in the membranous V0 complex through interaction with A-kinase protein. It seems that the C subunit serves as a substrate for the A-kinase protein and its phosphorylation may be the main mechanism of forming the active V1V0 holoenzyme (70).

Another mechanism of reversible dissociation regulated by the C subunit is the separation of V1V0 holoenzyme in V1 and V0 subcomplex, which is carried out through binding this

holoenzyme to the F-actin next to the basement membrane of epithelial cells. It seems that the C subunit acts as an anchor protein, allowing the connection between the V-ATPase and the actinic cytoskeleton (32).

In a study of our research group, we have demonstrated the overexpression of the ATP6V1C1 gene in OSCC biopsies. It seems that the C1 subunit of V-ATPases is responsible for allowing the assembly of membranous V0 component and cytosolic catalytic component (31) (Fig. 4). The RAVE complex (V-ATPase regulator and endosomal membranes) is essential for stable assembly of the C subunit of V-ATPase (64,71).

Smardon and Kane found *in vitro* that without the C subunit, the assembly of the two domains occurred, but the V1V0 complex was highly unstable and the activity of the V-ATPase extremely low, suggesting the exclusivity of the C subunit in regulating the complex V1V0 assembly. In the same way, the C subunit is incapable of getting assembled to the V-ATPase without RAVE and therefore, the enzyme activity is lost (71). These data are supported by the study made by Keenan and Kane who find a 48% higher decrease in catalytic activity, without affecting the enzyme assembly in experimental models with different mutations in the gene of the C subunit (72).

Previous studies suggest that the cells that express high levels of C subunit have an increased resistance to chemotherapeutic agents, so they may be a possible target in anticancer therapy (73).

Murakami *et al* found an overexpression of the ATP6C gene or C subunit in the cisplatin-resistant tumors, a logical fact given the V-ATPase increased number and activity in cases of chemoresistance and the importance of this subunit in the regulation of the pump (74).

5. Conclusions

Cell pH is crucial for several biological functions such as cell proliferation, invasion and metastasis, drug resistance and apoptosis. The hypoxic conditions are frequent phenomena during the development of oral cancer and trigger an intra- and extracellular acidosis. This cellular acidosis seems to be mainly controlled by the V-ATPases, which are clearly involved in cell transformation, carcinogenesis and metastasis.

The inhibition of V-ATPase with PPIS allows the anti-cancer drugs to enter and act within the tumor cells, causing apoptotic mechanisms that lead to the inhibition of tumor growth.

The involvement of the C subunit of the V1 domain in the enzymatic function of the V-ATPases, highlights the need for further research of specific inhibitors of the above-mentioned subunit in order to control the disastrous consequences of cancer.

References

- Martinez-Zaguilan R, Seftor EA, Seftor RE, Chu YW, Gillies RJ and Hendrix MJ: Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 14: 176-186, 1996.
- Raghunand N, Mahoney B, van Sluis R, Baggett B and Gillies RJ: Acute metabolic alkalosis enhances response of C3H mouse mammary tumors to the weak base mitoxantrone. *Neoplasia* 3: 227-235, 2001.
- Morita T, Nagaki T, Fukuda I and Okumura K: Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutat Res* 268: 297-305, 1992.
- De Milito A and Fais S: Proton pump inhibitors may reduce tumour resistance. *Expert Opin Pharmacother* 6: 1049-1054, 2005.
- Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Uramoto H, Yoshida Y, Tanabe M, *et al*: Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 29: 541-549, 2003.
- Torigoe T, Izumi H, Ise T, Murakami T, Uramoto H and Ishiguchi H: Vacuolar H(+)-ATPase: functional mechanisms and potential as a target for cancer chemotherapy. *Anticancer Drugs* 13: 237-243, 2002.
- Gillies RJ, Raghunand N, Karczmar GS and Bhujwalla ZM: MRI of the tumor microenvironment. *J Magn Reson Imaging* 16: 430-450, 2002.
- Reshkin SJ, Bellizzi A, Caldeira S, Albarani V, Malanchi I and Poignee M: Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J* 14: 2185-2197, 2000.
- Juel C: Lactate-proton cotransport in skeletal muscle. *Physiol Rev* 77: 321-358, 1997.
- Raghunand N and Gillies RJ: pH and drug resistance in tumors. *Drug Resist Updat* 3: 39-47, 2000.
- Cardone RA, Casavola V and Reshkin SJ: The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer* 5: 786-795, 2005.
- Sennoune SR, Luo D and Martinez-Zaguilan R: Plasmalemmal vacuolar-type H⁺-ATPase in cancer biology. *Cell Biochem Biophys* 40: 185-206, 2004.
- Hagag N, Lacal JC, Graber M, Aaronson S and Viola MV: Microinjection of ras p21 induces a rapid rise in intracellular pH. *Mol Cell Biol* 7: 1984-1988, 1987.
- Ober SS and Pardee AB: Intracellular pH is increased after transformation of Chinese hamster embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2766-2770, 1987.
- Reshkin SJ, Bellizzi A, Albarani V, Guerra L, Tommasino M and Paradiso A: Phosphoinositide 3-kinase is involved in the tumor-specific activation of human breast cancer cell Na(+)/H(+) exchange, motility, and invasion induced by serum deprivation. *J Biol Chem* 275: 5361-5369, 2000.
- Siczkowski M, Davies JE and Ng LL: Activity and density of the Na⁺/H⁺ antiporter in normal and transformed human lymphocytes and fibroblasts. *Am J Physiol* 267: C745-C752, 1994.
- Doppler W, Jaggi R and Groner B: Induction of v-mos and activated Ha-ras oncogene expression in quiescent NIH 3T3 cells causes intracellular alkalinisation and cell-cycle progression. *Gene* 54: 147-153, 1987.
- Pouyssegur J, Franchi A and Pages G: pHi, aerobic glycolysis and vascular endothelial growth factor in tumour growth. *Novartis Found Symp* 240: 186-196, 2001.
- Newell K, Franchi A, Pouyssegur J and Tannock I: Studies with glycolysis-deficient cells suggest that production of lactic acid is not the only cause of tumor acidity. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1127-1131, 1993.
- Yamagata M, Hasuda K, Stamato T and Tannock IF: The contribution of lactic acid to acidification of tumours: studies of variant cells lacking lactate dehydrogenase. *Br J Cancer* 77: 1726-1731, 1998.
- De Milito A and Fais S: Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors. *Future Oncol* 1: 779-786, 2005.
- Nelson N and Harvey WR: Vacuolar and plasma membrane proton-*q*-denosinetriphosphatases. *Physiol Rev* 79: 361-385, 1999.
- Saroussi S and Nelson N: Vacuolar H(+)-ATPase-an enzyme for all seasons. *Pflugers Arch* 457: 581-587, 2009.
- Martinez-Zaguilan R, Lynch RM, Martinez GM and Gillies RJ: Vacuolar-type H(+)-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 265: C1015-C1029, 1993.
- McLean LA, Roscoe J, Jorgensen NK, Gorin FA and Cala PM: Malignant gliomas display altered pH regulation by NHE1 compared with nontransformed astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C676-C688, 2000.
- Perona R and Serrano R: Increased pH and tumorigenicity of fibroblasts expressing a yeast proton pump. *Nature* 334: 438-440, 1988.

27. Sennoune SR and Martinez-Zaguilan R: Plasmalemmal vacuolar H⁺-ATPases in angiogenesis, diabetes and cancer. *J Bioenerg Biomembr* 39: 427-433, 2007.
28. Montcourrier P, Silver I, Farnoud R, Bird I and Rochefort H: Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism. *Clin Exp Metastasis* 15: 382-392, 1997.
29. Parkins CS, Stratford MR, Dennis MF, Stubbs M and Chaplin DJ: The relationship between extracellular lactate and tumour pH in a murine tumour model of ischaemia-reperfusion. *Br J Cancer* 75: 319-323, 1997.
30. Sennoune SR, Bakunts K, Martinez GM, Chua-Tuan JL, Kebir Y, Attaya MN, *et al*: Vacuolar H⁺-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C1443-C1452, 2004.
31. Otero-Rey EM, Somoza-Martin M, Barros-Angueira F and Garcia-Garcia A: Intracellular pH regulation in oral squamous cell carcinoma is mediated by increased V-ATPase activity via over-expression of the ATP6V1C1 gene. *Oral Oncol* 44: 193-199, 2008.
32. Vitavska O, Wieczorek H and Merzendorfer H: A novel role for subunit C in mediating binding of the H⁺-V-ATPase to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 278: 18499-18505, 2003.
33. Izumi H, Ise T, Murakami T, Torigoe T, Ishiguchi H and Uramoto H: Structural and functional characterization of two human V-ATPase subunit gene promoters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1628: 97-104, 2003.
34. Orive G, Reshkin SJ, Harguindey S and Pedraz JL: Hydrogen ion dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in cancer angiogenesis and antiangiogenesis. *Br J Cancer* 89: 1395-1399, 2003.
35. Rojas JD, Sennoune SR, Maiti D, Bakunts K, Reuveni M, Sanka SC, *et al*: Vacuolar-type H⁺-ATPases at the plasma membrane regulate pH and cell migration in microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1147-H1157, 2006.
36. Martínez-Zaguilán R, Raghunand N, Lynch RM, Bellamy W, Martinez GM and Rojas B: pH and drug resistance. I. functional expression of plasmalemmal V-type H⁺-ATPase in drug-resistant human breast carcinoma cell lines. *Biochem Pharmacol* 57: 1037-1046, 1999.
37. Nishi T and Forgac M: The vacuolar (H⁺)-ATPases-nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 94-103, 2002.
38. Nelson N, Perzov N, Cohen A, Hagai K, Padler V and Nelson H: The cellular biology of proton-motive force generation by V-ATPases. *J Exp Biol* 203: 89-95, 2000.
39. Fais S, De Mito A, You H and Qin W: Targeting vacuolar H⁺-ATPases as a new strategy against cancer. *Cancer Res* 67: 10627-10630, 2007.
40. Moriyama Y and Nelson N: Inhibition of vacuolar H⁺-ATPases by fusidic acid and suramin. *FEBS Lett* 234: 383-386, 1988.
41. Boyd MR, Farina C, Belfiore P, Gagliardi S, Kim JW and Hayakawa Y: Discovery of a novel antitumor benzolactone enamide class that selectively inhibits mammalian vacuolar-type (H⁺)-ATPases. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 114-120, 2001.
42. Nishihara T, Akifusa S, Koseki T, Kato S, Muro M and Hanada N: Specific inhibitors of vacuolar type H(+) -ATPases induce apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 212: 255-262, 1995.
43. De Mito A, Iessi E, Logozzi M, Lozupone F, Spada M and Marino ML: Proton pump inhibitors induce apoptosis of human B-cell tumors through a caspase-independent mechanism involving reactive oxygen species. *Cancer Res* 67: 5408-5417, 2007.
44. Bahar G, Feinmesser R, Shpitzer T, Popovtzer A and Nagler RM: Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. *Cancer* 109: 54-59, 2007.
45. Yoshimoto Y and Imoto M: Induction of EGF-dependent apoptosis by vacuolar-type H(+) -ATPase inhibitors in A431 cells overexpressing the EGF receptor. *Exp Cell Res* 279: 118-127, 2002.
46. Germanov E, Berman JN and Guernsey DL: Current and future approaches for the therapeutic targeting of metastasis (review). *Int J Mol Med* 18: 1025-1036, 2006.
47. Lu X, Qin W, Li J, Tan N, Pan D, Zhang H, *et al*: The growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma xenografts are inhibited by small interfering RNA targeting to the subunit ATP6L of proton pump. *Cancer Res* 65: 6843-6849, 2005.
48. Ohta T, Numata M, Yagishita H, Futagami F, Tsukioka Y and Kitagawa H: Expression of 16 kDa proteolipid of vacuolar-type H(+) -ATPase in human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 73: 1511-1517, 1996.
49. Goldstein DJ, Finbow ME, Andresson T, McLean P, Smith K and Bubb V: Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the 16K component of vacuolar H(+)-ATPases. *Nature* 352: 347-349, 1991.
50. Andresson T, Sparkowski J, Goldstein DJ and Schlegel R: Vacuolar H(+)-ATPase mutants transform cells and define a binding site for the papillomavirus E5 oncoprotein. *J Biol Chem* 270: 6830-6837, 1995.
51. Schapiro F, Sparkowski J, Adduci A, Supryniewicz F, Schlegel R and Grinstein S: Golgi alkalization by the papillomavirus E5 oncoprotein. *J Cell Biol* 148: 305-315, 2000.
52. Huss M, Ingenhorst G, König S, Gassel M, Drose S, Zeeck A, *et al*: Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V(o) subunit c. *J Biol Chem* 277: 40544-40548, 2002.
53. Fernandes F, Loura LM, Fedorov A, Dixon N, Kee TP and Prieto M: Binding assays of inhibitors towards selected V-ATPase domains. *Biochim Biophys Acta* 1758: 1777-1786, 2006.
54. Menche D, Hassfeld J, Sasse F, Huss M and Wieczorek H: Design, synthesis, and biological evaluation of novel analogues of archazolid: a highly potent simplified V-ATPase inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 1732-1735, 2007.
55. Petrangolini G, Supino R, Pratesi G, Bo LD, Tortoreto M and Croce AC: Effect of a novel vacuolar-H⁺-ATPase inhibitor on cell and tumor response to camptothecins. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 939-946, 2006.
56. Niikura K: Effect of a V-ATPase inhibitor, FR202126, in syngeneic mouse model of experimental bone metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 60: 555-562, 2007.
57. Smith AN, Borthwick KJ and Karet FE: Molecular cloning and characterization of novel tissue-specific isoforms of the human vacuolar H(+)-ATPase C, G and d subunits, and their evaluation in autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Gene* 297: 169-177, 2002.
58. Svergun DI, Konrad S, Huss M, Koch MH, Wieczorek H and Altendorf K: Quaternary structure of V1 and F1 ATPase: significance of structural homologies and diversities. *Biochemistry* 37: 17659-17663, 1998.
59. Armbruster A, Svergun DI, Coskun U, Juliano S, Bailer SM and Gruber G: Structural analysis of the stalk subunit Vma5p of the yeast V-ATPase in solution. *FEBS Lett* 570: 119-125, 2004.
60. Zhang Z, Inoue T, Forgac M and Wilkens S: Localization of subunit C (Vma5p) in the yeast vacuolar ATPase by immuno electron microscopy. *FEBS Lett* 580: 2006-2010, 2006.
61. Chaban YL, Juliano S, Boekema EJ and Gruber G: Interaction between subunit C (Vma5p) of the yeast vacuolar ATPase and the stalk of the C-depleted V(1) ATPase from *Manduca sexta* midgut. *Biochim Biophys Acta* 1708: 196-200, 2005.
62. Drory O, Frolow F and Nelson N: Crystal structure of yeast V-ATPase subunit C reveals its stator function. *EMBO Rep* 5: 1148-1152, 2004.
63. Inoue T and Forgac M: Cysteine-mediated cross-linking indicates that subunit C of the V-ATPase is in close proximity to subunits E and G of the V1 domain and subunit a of the V0 domain. *J Biol Chem* 280: 27896-27903, 2005.
64. Forgac M: Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 917-929, 2007.
65. Peng S, Stone D and Xie X: Reconstitution of recombinant 40-kDa subunit of the clathrin-coated vesicle H(+)-ATPase. *J Biol Chem* 268: 23519-23523, 1993.
66. Gruber G: Structural features and nucleotide-binding capability of the C subunit are integral to the regulation of the eukaryotic V1Vo ATPases. *Biochem Soc Trans* 33: 883-885, 2005.
67. Armbruster A, Hohn C, Hermesdorf A, Schumacher K, Borsch M and Gruber G: Evidence for major structural changes in subunit C of the vacuolar ATPase due to nucleotide binding. *FEBS Lett* 579: 1961-1967, 2005.
68. Puopolo K, Szczek M, Magner R and Forgac M: The 40-kDa subunit enhances but is not required for activity of the coated vesicle proton pump. *J Biol Chem* 267: 5171-5176, 1992.
69. Beltran C, Kopecky J, Pan YC, Nelson H and Nelson N: Cloning and mutational analysis of the gene encoding subunit C of yeast vacuolar H(+)-ATPase. *J Biol Chem* 267: 774-779, 1992.

70. Voss M, Vitavska O, Walz B, Wieczorek H and Baumann O: Stimulus-induced phosphorylation of vacuolar H(+)-ATPase by protein kinase A. *J Biol Chem* 282: 33735-33742, 2007.
71. Smardon AM and Kane PM: RAVE is essential for the efficient assembly of the C subunit with the vacuolar H(+)-ATPase. *J Biol Chem* 282: 26185-26194, 2007.
72. Keenan Curtis K and Kane PM: Novel vacuolar H⁺-ATPase complexes resulting from overproduction of Vma5p and Vma13p. *J Biol Chem* 277: 2716-2724, 2002.
73. Ma L and Center MS: The gene encoding vacuolar H(+)-ATPase subunit C is overexpressed in multidrug-resistant HL60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 675-681, 1992.
74. Murakami T, Shibuya I, Ise T, Chen ZS, Akiyama S and Nakagawa M: Elevated expression of vacuolar proton pump genes and cellular PH in cisplatin resistance. *Int J Cancer* 93: 869-874, 2001.
75. Bowman BJ and Bowman EJ: Mutations in subunit C of the vacuolar ATPase confer resistance to bafilomycin and identify a conserved antibiotic binding site. *J Biol Chem* 277: 3965-3972, 2002.
76. Martinez Muñoz GA and Kane P: Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *J Biol Chem* 283: 20309-20319, 2008.

Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer (Review)

MARIO PÉREZ-SAYÁNS¹, JOSÉ MANUEL SOMOZA-MARTÍN¹, FRANCISCO BARROS-ANGUEIRA²,
MARÍA DOLORES REBOIRAS-LÓPEZ¹, JOSÉ MANUEL GÁNDARA REY¹ and ABEL GARCÍA-GARCÍA¹

¹Facultad de Odontología, Entreríos s/n, Santiago de Compostela, C.P. 15782; ²Unity of Molecular Medicine, Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Hospital Clínico Universitario, Santiago de Compostela, C.P. 15706, Spain

Received July 6, 2009; Accepted August 10, 2009

DOI: 10.3892/or_00000565

Abstract. The development of oral squamous cell cancer (OSCC) is a multistep process involving the accumulation of multiple genetic alterations modulated by genetic predisposition and environmental influences such as tobacco and alcohol use, chronic inflammation, and viral infections. All of these factors can lead to a wide range of genetic and molecular alterations that can be detected using a range of molecular studies. The alterations mostly affect two large groups of genes: oncogenes and tumor suppressor genes, which can be either inactivated or overexpressed through mutations, loss of heterozygosity, deletions, or epigenetic modifications such as methylation. Other molecules that are closely associated with tumor pathogenesis and prognosis also exist and warrant further study. Important advances in molecular biology are helping to shed light on oral cancer and thus aiding in the early diagnosis and development of new personalized treatment approaches. The purpose of the review is to explore the genetic and molecular alterations associated with OSCC.

Contents

1. Introduction
2. Differential gene expression in oral squamous cell carcinoma
3. Genetic and epigenetic anomalies in OSCC
4. Other molecules associated with OSCC
5. Conclusions

1. Introduction

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignancy of the oral cavity. Accounting for between 90 and 95% of all malignant lesions of the mouth, OSCC

has become practically synonymous with oral cancer. Based on statistics from June 24, 2008, the American Cancer Society reported that 1,437,181 new cancer cases and 565,650 cancer-related deaths were expected in the United States in 2008 (1). The estimated number of cases of oral cavity cancers was 22,900, equivalent to 3% all cancer cases.

Carcinogenesis is a multistep process modulated by both environmental and genetic factors (Fig. 1). As early as 1988, Boyd and Reade (2) described the different mechanisms involved in carcinogenesis of the oral mucosa and distinguished between 2 major groups: chemical mechanisms, physical mechanisms, and viral mechanisms (2). More than a decade later, Hanahan and Weinberg (3) described 6 hallmarks of cancer: acquisition of growth signaling autonomy (oncogenes), growth-inhibitory signals (tumor suppressor genes), evasion of apoptosis, cellular immortalization, angiogenesis, and finally, invasion and metastasis.

2. Differential gene expression in oral squamous cell carcinoma

Numerous methods are available for directly analyzing tumor DNA, either directly in the tumor tissue itself or in previously prepared tissue. The most common methods are *in situ* hybridization, Southern and Northern blot analysis, polymerase chain reaction (PCR), and automatic DNA sequencing. Microarray technology, for its part, is particularly useful for establishing general gene expression patterns and for screening for differential gene expression. Array results, however, need to be validated using an alternative method such as Northern blot analysis or quantitative real-time (RT) PCR, used to evaluate product accumulation during the log phase of the reaction. Quantitative RT-PCR, currently considered the most reliable and reproducible gene quantification method available, is the most widely used technique for validating gene expression results obtained using microarray technology (5-7). To determine gene expression in OSCC, many researchers have combined DNA microarray hybridization with other molecular methods (such as quantitative RT-PCR) that measure differential gene expression.

A large number of studies have used DNA microarray technology to profile gene expression patterns in head and neck cancer and in OSCC in particular (8-29). The majority of these studies have concluded that there is a possible association between different genes and squamous cell

Correspondence to: Dr Mario Pérez-Sayáns, Facultad de Odontología, Entreríos s/n, Santiago de Compostela, C.P. 15782, Spain
E-mail: perezsayans@gmail.com

Key words: oncogenes, tumor suppressor genes, oral squamous cell carcinoma, methylation

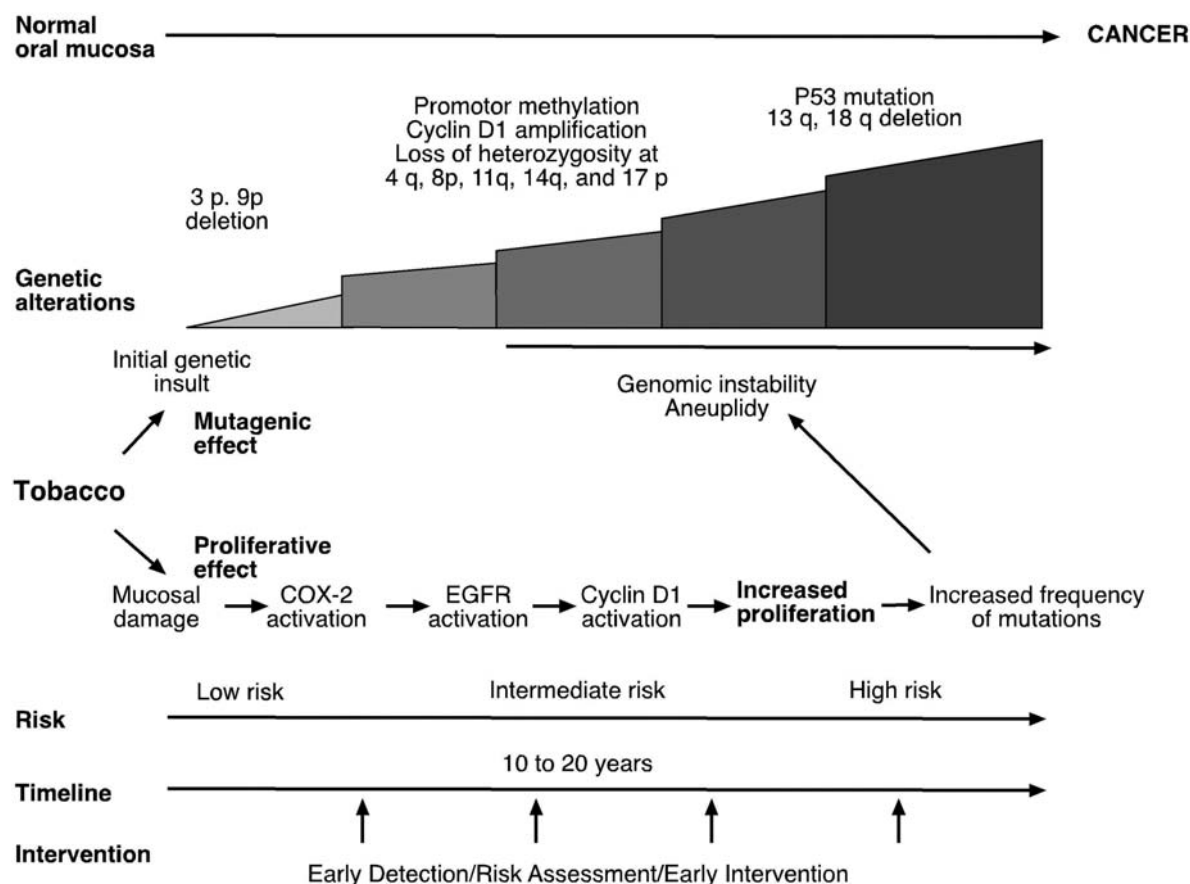


Figure 1. Chronic exposure to carcinogens such as tobacco causes genetic changes in the epithelial cells of the oral mucosa. The accumulation of genetic insults leads to genomic instability, the development of premalignant lesions, and ultimately invasive carcinoma. Carcinogens also have parallel indirect effects such as the induction of proliferative activity through, for example, the epidermal growth factor receptor (EGFR). COX, cyclooxygenase; RAR, retinoic acid receptor. Obtained from (18).

carcinoma. Many of the genes implicated have been previously described and are well known, but others have an unknown biological function and have yet to be analyzed in depth. Based on the results of these microarray studies, these new genes can now be investigated individually to determine their nature and function.

In a relatively recent study, our research group studied gene expression profiles in 5 patients with OSCC using the Atlas Glass Human 3.8 I Microarray (Fig. 2) (30). This microarray consists of 3,888 spots, including 3,757 oligonucleotides, 9 house-keeping genes, and controls. The genes, all well known and characterized, have a wide range of biological functions. Statically significant differences were found between tumor tissue and normal tissue for 426 genes, 322 (75.58%) of which were overexpressed and 104 (24.41%) of which were under-expressed. Interestingly, while the genes found to be differentially expressed varied to some extent between analyses, the biological functions they encoded were identical (Table I) (30).

3. Genetic and epigenetic anomalies in OSCC

To facilitate comprehension, we have classified the genetic and epigenetic anomalies associated with OSCC according to the type of structure affected (chromosome, allele, onco-

gene, tumor suppressor gene, or nucleotide) and the type of anomaly (polymorphism, point mutation, deletion, and other alterations).

There are reports of frequent chromosomal aberrations (deletions) at 2q21-24, 2q33-35, and 2q37 which affect numerous tumor suppressor genes including *LRP1B*, *CASP8*, *CASP10*, *BARD1*, *ILKAP*, *PPP1R7*, and *ING5* (31). One recent study reported that the loss of alleles 3p14 and 9p21 occurs early on in the development of OSCC tumors and can even occur in simple keratosis (32). Polysomy 3, for its part, is more common than polysomy 9 and is characteristic of dysplasia and *in situ* carcinoma (33).

A high frequency of loss of heterozygosity (LOH) at chromosomal loci 13q and 17p has been described in premalignant oral lesions and early carcinomas (34). The affected regions harbor important genes whose suppressor function in the development of tumors is probably severely altered by this LOH. Chromosome 9 appears to be one of the regions that is altered most often and earliest in tumor development; allelic losses at 9p21, for example, have been described in the majority of premalignant oral lesions and early carcinomas (Fig. 3) (35).

The 9p21 region harbors genes that code for the cyclin-dependent kinase inhibitors p16 and p14, two important regulators of cell proliferation. Several regions of chromo-

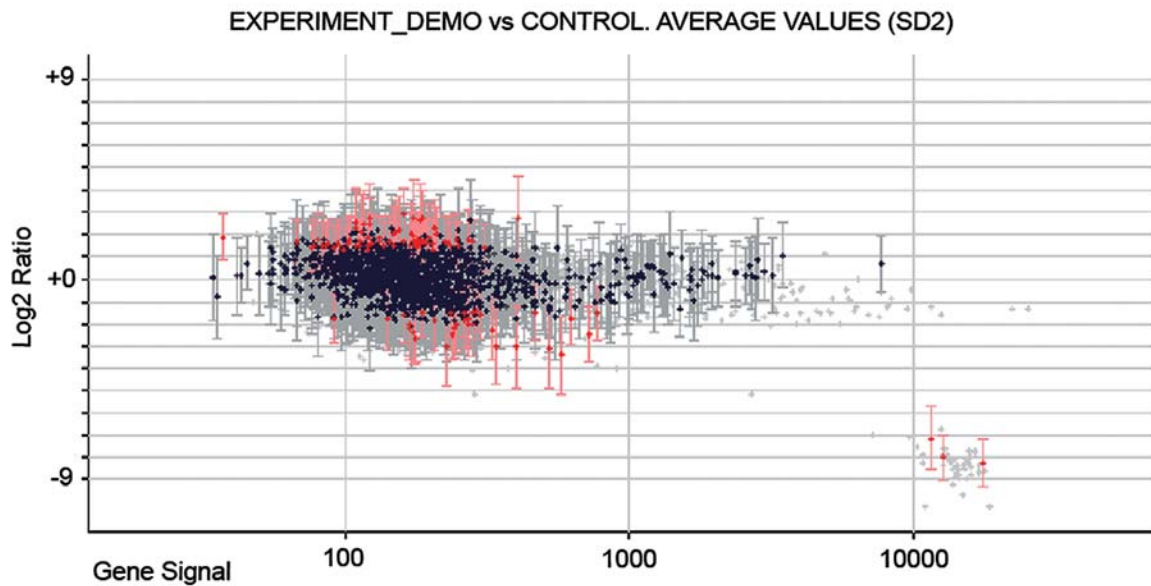


Figure 2. Log2 graph showing Cy3/Cy5 ratio (after normalization of data using the Lowess method) and signal intensity of each microarray spot. The red dots (426 genes and 86 controls) correspond to significantly differentially expressed genes ($P=0.05$, t-test) in tumor tissue compared to normal tissue. The vertical bars show the standard deviation. Obtained from (29).

Table I. Number and percentages of genes in each functional category showing significant differences in expression (t-tests, $p<0.05$) between normal and tumoral tissue.

Function	Total no.	% Total	No. up-regulated	% up-regulated	No. down-regulated	% down-regulated
Cell surface antigens	8	1.87	5	1.55	3	2.88
Transcription factors	52	12.20	33	10.24	19	18.26
Cell cycle proteins	3	0.70	3	0.93	0	0
Cell adhesion receptors/proteins	22	5.16	19	5.90	3	2.88
Immune system proteins	8	1.87	5	1.55	3	2.88
Extracellular transport/carrier proteins	17	3.99	11	3.41	6	5.76
Oncogenes and tumor suppressors	11	2.58	8	2.48	3	2.88
Stress response proteins	14	3.28	10	3.10	4	3.84
Membrane channels and transporters	27	6.33	19	5.90	8	7.69
Extracellular matrix proteins	8	1.87	5	1.55	3	2.88
Trafficking/targeting proteins	39	9.15	28	8.69	11	10.57
Metabolism proteins	80	18.77	68	21.11	12	11.53
Post-translational modification/protein folding	18	4.22	13	4.03	5	4.80
Translation	26	6.10	17	5.27	9	8.65
Apoptosis associated proteins	6	1.40	4	1.24	2	1.92
RNA processing, turnover, and transport	11	2.58	11	3.41	0	0
DNA binding and chromatin proteins	5	1.17	4	1.24	1	0.96
Cell receptors	38	8.92	33	10.24	3	2.88
Cell signaling, extracellular communication proteins	19	4.46	14	4.34	5	4.80
Intracellular transducers/effectors/modulators	53	12.44	36	11.18	17	16.34
Protein turnover	22	5.16	15	4.65	7	6.73
Cytoskeleton/motility proteins	25	5.86	22	6.83	3	2.88
DNA synthesis, recombination, and repair	11	2.58	5	1.55	6	5.76
Functionally unclassified	17	3.99	14	4.34	3	2.88

Obtained from (30).

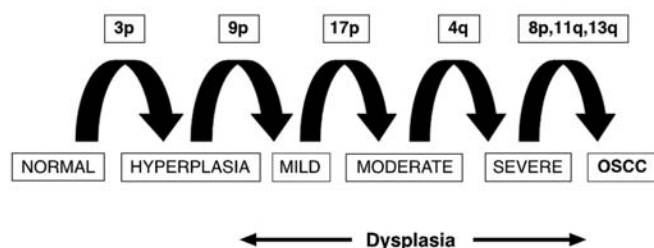


Figure 3. Molecular model of oral carcinogenesis. The diagram shows the genetic progression from dysplasia to oral squamous cell carcinoma (OSCC), through changes in the p or q arm of chromosomes 3, 4, 8, 9, 11, 13, and 17. Adapted from (64).

some 3, in particular 3p25, 3p21, and 3p13-14, commonly harbor chromosomal aberrations in oral cancer, although it is not yet known which genes are affected (36). Other aberrations such as allelic losses at 5q21-22, 22q13, 4q, 11q, 18q, and 21q, are often found in association with advanced tumor stages and poorly differentiated carcinomas (37).

Recent studies have identified allelic polymorphisms in the genes *HLA* and *MICA* (major histocompatibility complex-class-I-chain-related gene A) (38). In one of these studies, HLA-B35 and HLA-B40 were strongly associated with tumor metastasis (39).

Anomalies in certain oncogenes such as *ErbB1* (*Her-1*), *ErbB2*, and *N-, K- and H-ras* have not been found to play a key role in oral cancer (40-43). When altered, genes that code for the synthesis of cyclin proteins, may act as oncogenes. Overexpression of *CCND1*, for example, can induce overexpression of the cyclin D1 protein, which has been associated with poor prognosis in early-stage oral tumors (44-46).

Tumor suppressor gene anomalies are also found in malignant oral lesions. Most oral carcinomas are characterized by aberrant expression of at least one of the members of the retinoblastoma (pRb) family of growth suppressor proteins. *CDKN2A*, for example, which encodes the protein p16, is located at locus 9p21, one of the most vulnerable areas of the human genome in oral cancer, while p14, the alternative transcript of the same gene, is frequently deleted in malignant oral lesions. One of the most important tumor suppressor genes in humans is *TP53* (47). The functions of this gene and its molecular system have been found to be suppressed in numerous tumors, constituting one of the earliest findings in the natural history of oral cancer (48,49).

Three single nucleotide polymorphisms detected in the promoter region of the *DNMT3B* gene-*C46359T* [-149C>T], -238T>C, and -579>T-might play a causative role in several cancers, including OSCC (50).

In contrast, in OSCC, the base excision repair pathway, which comprises the genes *MUTYH*, *OGG1*, and *MTH1* and which repairs mutations that involve 8-oxoguanine, has been seen to play a very small or possibly even non-existent role in tumor development (51). Similar findings have been reported following argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) analyses, although the results have been disputed (18). According to Teresa *et al* and Costa *et al* AgNOR and Ki-67 analyses can be used to determine proliferative states

of epithelial cells in oral cancer (39,52), and Schwartz *et al* have shown levels of proliferating cell nuclear antigen to be increased in an experimental model (53).

Our research group found a very interesting association between OSCC and overexpression of *ATP6V1C1* 54, which seems to be the main gene involved in the regulation of V-ATPase enzymes and the acidity of solid oral tumors (54).

The most common epigenetic alteration is DNA methylation. Imai *et al* (55) recently demonstrated that Ras association family genes (*RASSF*) were altered in OSCC. In particular, they found *RASSF2* to be methylated in 26% of OSCC tumors analyzed (55).

4. Other molecules associated with OSCC

Other molecules that have been associated with OSCC are cyclo-oxygenase 2 (COX-2), which has been found in high levels in dysplastic lesions (56); the human trophoblast cell-surface antigen (TROP2), which appears to be associated with shorter survival (57); and the epithelial adhesion molecule (EpCAM), which has been associated with tumor size, regional lymph node metastasis, histologic differentiation, and an invasive pattern (31). The connective tissue growth factor, CCN2 (also known as CTGF), was recently associated with head and neck squamous cell cancer; findings included high levels of messenger RNA (mRNA) and its protein in stromal fibroblasts, tumor cells, and vascular endothelial cells (58). Overexpression of *MMP-2* and *MMP-9* has been associated with the invasive potential of tumors and levels of alcohol, leading several authors to hypothesize that alcohol might play a role in oral carcinogenesis through the stimulation of these genes (37).

It has been shown that molecular analysis of saliva can be used to study genomic DNA expression but not mRNA expression (59). Other studies have detected the soluble fragment of cytokeratin 19, Cyfra 21-1, in patients with OSCC, although further studies are required to determine the true diagnostic and prognostic value of this marker (60,61). Recent studies have shown that the determination of proteins and oxidized DNA levels in saliva might indicate high levels of reactive oxygen species, which appear to be involved in the development of OSCC (62).

Other recent findings in this area include the observation of an association between oral cancer and a set of new molecules called advanced glycation endproducts (AGEs) and their receptors (RAGEs) (63). According to the authors of the study, RAGE expression decreases with an increase in OSCC differentiation. RAGEs, for example, are expressed in 100% of normal epithelial cells but in 0% of poorly differentiated OSCC cells.

5. Conclusions

Oral carcinogenesis is a multifactorial process involving numerous genetic processes that can alter the function of oncogenes, tumor suppressor genes, and other related molecules. The resulting anomalies can increase the production of growth factors and the number of cell surface receptors, and/or increase transcription or intracellular messenger factor levels. These changes can, in turn, cause a loss of tumor

suppressor activity and give rise to a phenotype capable of increasing cellular proliferation, weakening cell cohesion, and causing local infiltration and metastasis.

References

- Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al*: Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 58: 71-96, 2008.
- Boyd NM and Reade PC: Mechanisms of carcinogenesis with particular reference to the oral mucosa. *J Oral Pathol* 17: 193-201, 1988.
- Hanahan D and Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70, 2000.
- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, *et al*: Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21: 10-14, 1999.
- Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, *et al*: Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J Mol Diagn* 3: 26-31, 2001.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G and Watson R: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 11: 1026-1030, 1993.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA and Rasmussen RP: Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22: 130-131, 134-138, 1997.
- Alevizos I, Mahadevappa M, Zhang X, *et al*: Oral cancer in vivo gene expression profiling assisted by laser capture microdissection and microarray analysis. *Oncogene* 20: 6196-6204, 2001.
- Al Moustafa AE, Alaoui-Jamali MA, Batist G, *et al*: Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene* 21: 2634-2640, 2002.
- Francioso F, Carinci F, Tosi L, *et al*: Identification of differentially expressed genes in human salivary gland tumors by DNA microarrays. *Mol Cancer Ther* 1: 533-538, 2002.
- Hartmann KA, Modlich O, Prisack HB, *et al*: Gene expression profiling of advanced head and neck squamous cell carcinomas and two squamous cell carcinoma cell lines under radio/chemotherapy using cDNA arrays. *Radiother Oncol* 63: 309-320, 2002.
- Zhang X, Liu Y, Gilcrease MZ, Yuan, *et al*: A lymph node metastatic mouse model reveals alterations of metastasis-related gene expression in metastatic human oral carcinoma sublines selected from a poorly metastatic parental cell line. *Cancer* 95: 1663-1672, 2002.
- Mendez E, Cheng C, Farwell DG, *et al*: Transcriptional expression profiles of oral squamous cell carcinomas. *Cancer* 95: 1482-1494, 2002.
- Ibrahim SO, Aarsaether N, Holsve MK, *et al*: Gene expression profile in oral squamous cell carcinomas and matching normal oral mucosal tissues from black Africans and white Caucasians: the case of the Sudan vs. Norway. *Oral Oncol* 39: 37-48, 2003.
- Kuo WP, Hasina R, Ohno-Machado L and Lingen MW: Classification and identification of genes associated with oral cancer based on gene expression profiles. A preliminary study. *N Y State Dent J* 69: 23-26, 2003.
- Hwang D, Alevizos I, Schmitt WA, *et al*: Genomic dissection for characterization of cancerous oral epithelium tissues using transcription profiling. *Oral Oncol* 39: 259-268, 2003.
- Nagata M, Fujita H, Ida H, *et al*: Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. *Int J Cancer* 106: 683-689, 2003.
- Brinkman BM and Wong DT: Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 18: 228-233, 2006.
- Ziobor AF, Patel KR, Alawi F, *et al*: Identification of a gene signature for rapid screening of oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 12: 5960-5971, 2006.
- Nguyen ST, Hasegawa S, Tsuda H, *et al*: Identification of a predictive gene expression signature of cervical lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 98: 740-746, 2007.
- Martinez I, Wang J, Hobson KF, *et al*: Identification of differentially expressed genes in HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer* 43: 415-432, 2007.
- Chang JT, Wang HM, Chang KW, *et al*: Identification of differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma (OSCC): overexpression of NPM, CDK1 and NDRG1 and under-expression of CHES1. *Int J Cancer* 114: 942-949, 2005.
- Arora S, Matta A, Shukla NK, *et al*: Identification of differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma. *Mol Carcinog* 42: 97-108, 2005.
- Jeon GA, Lee JS, Patel V, *et al*: Global gene expression profiles of human head and neck squamous carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 112: 249-258, 2004.
- Ginos MA, Page GP, Michalowicz BS, *et al*: Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 64: 55-63, 2004.
- Gonzalez HE, Gujrati M, Frederick M, *et al*: Identification of 9 genes differentially expressed in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129: 754-759, 2003.
- Leethanakul C, Knezevic V, Patel V, *et al*: Gene discovery in oral squamous cell carcinoma through the Head and Neck Cancer Genome Anatomy Project: confirmation by microarray analysis. *Oral Oncol* 39: 248-258, 2003.
- Steinau M, Lee DR, Rajeevan MS, *et al*: Gene expression profile of cervical tissue compared to exfoliated cells: impact on biomarker discovery. *BMC Genomics* 6: 64, 2005.
- Choi S and Myers JN: Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res* 87: 14-32, 2008.
- Somoza-Martin JM, Garcia-Garcia A, Barros-Angueira F, *et al*: Gene expression profile in oral squamous cell carcinoma: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 63: 786-792, 2005.
- Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, *et al*: Clinicopathologic significance of EpCAM expression in squamous cell carcinoma of the tongue and its possibility as a potential target for tongue cancer gene therapy. *Oral Oncol* 43: 869-877, 2007.
- Uzawa N, Akanuma D, Negishi A, *et al*: Homozygous deletions on the short arm of chromosome 3 in human oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 37: 351-356, 2001.
- Schwarz S, Bier J, Driemel O, *et al*: Losses of 3p14 and 9p21 as shown by fluorescence in situ hybridization are early events in tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma and already occur in simple keratosis. *Cytometry A* 73: 305-311, 2008.
- El-Naggar AK, Hurr K, Batsakis JG, *et al*: Sequential loss of heterozygosity at microsatellite motifs in preinvasive and invasive head and neck squamous carcinoma. *Cancer Res* 55: 2656-2659, 1995.
- Ohta S, Uemura H, Matsui Y, *et al*: Alterations of p16 and p14ARF genes and their 9p21 locus in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 107: 81-91, 2009.
- Gebhart E, Liehr T, Wolff E, *et al*: Loss of 9p21 is embedded in a complex but consistent pattern of genomic imbalances in oral squamous cell carcinomas. *Cytogenet Genome Res* 101: 106-112, 2003.
- Moles MAG, Montoya JAG and Avila IR: Bases moleculares de la cancerización de cavidad oral. *Av Odontostomatol* 24: 55-60, 2008.
- Stephens HA, Vaughan RW, Collins R, *et al*: Towards a molecular phototyping system for allelic variants of MICA, encoded by polymorphisms in exons 2, 3 and 4 of MHC class I chain-related genes. *Tissue Antigens* 53: 167-174, 1999.
- Costa Ade L, de Araujo NS, Pinto Ddos S and de Araujo VC: PCNA/AgNOR and Ki-67/AgNOR double staining in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 28: 438-441, 1999.
- Brandt B, Meyer-Staeckling S, Schmidt H, *et al*: Mechanisms of EGFR gene transcription modulation: relationship to cancer risk and therapy response. *Clin Cancer Res* 12: 7252-7260, 2006.
- Silva SD, Perez DE, Alves FA, *et al*: ErbB2 and fatty acid synthase (FAS) expression in 102 squamous cell carcinomas of the tongue: correlation with clinical outcomes. *Oral Oncol* 44: 484-490, 2008.
- Schartinger VH, Kacani L, Andrlj J, *et al*: Pharmacodiagnostic value of the HER family in head and neck squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 66: 21-26, 2004.
- Vairaktaris E, Goutzanis L, Kalokerinos G, *et al*: Diabetes increases both N-ras and ets-1 expression during rat oral oncogenesis resulting in enhanced cell proliferation and metastatic potential. *In Vivo* 21: 615-621, 2007.

44. Zhou X, Zhang Z, Yang X, *et al*: Inhibition of cyclin D1 expression by cyclin D1 shRNAs in human oral squamous cell carcinoma cells is associated with increased cisplatin chemosensitivity. *Int J Cancer* 124: 483-489, 2009.
45. Sathyan KM, Nalinakumari KR, Abraham T and Kannan S: CCND1 polymorphisms (A870G and C1722G) modulate its protein expression and survival in oral carcinoma. *Oral Oncol* 44: 689-697, 2008.
46. Marsit CJ, Black CC, Posner MR and Kelsey KT: A genotype-phenotype examination of cyclin D1 on risk and outcome of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 14: 2371-2377, 2008.
47. Kozomara RJ, Brankovic-Magic MV, Jovic NR, *et al*: Prognostic significance of TP53 mutations in oral squamous cell carcinoma with human papilloma virus infection. *Int J Biol Markers* 22: 252-257, 2007.
48. Kresty LA, Mallery SR, Knobloch TJ, *et al*: Alterations of p16(INK4a) and p14(ARF) in patients with severe oral epithelial dysplasia. *Cancer Res* 62: 5295-5300, 2002.
49. Shintani S, Nakahara Y, Mihara M, *et al*: Inactivation of the p14(ARF), p15(INK4B) and p16(INK4A) genes is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 37: 498-504, 2001.
50. Van Heerden WF, Swart TJ, Robson B, *et al*: FHIT RNA and protein expression in oral squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 21: 2425-2428, 2001.
51. Van Heerden WF, Swart TJ, van Heerden MB, *et al*: Immunohistochemical evaluation of Fhit protein expression in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 28: 433-437, 1999.
52. Teresa DB, Neves KA, Neto CB and Fregonezi PA: Computer-assisted analysis of cell proliferation markers in oral lesions. *Acta Histochem* 109: 377-387, 2007.
53. Schwartz JL, Gu X, Kittles RA, *et al*: Experimental oral carcinoma of the tongue and buccal mucosa: possible biologic markers linked to cancers at two anatomic sites. *Oral Oncol* 36: 225-235, 2000.
54. Otero-Rey EM, Somoza-Martin M, Barros-Angueira F and Garcia-Garcia A: Intracellular pH regulation in oral squamous cell carcinoma is mediated by increased V-ATPase activity via over-expression of the ATP6V1C1 gene. *Oral Oncol* 44: 193-199, 2008.
55. Imai T, Toyota M, Suzuki H, *et al*: Epigenetic inactivation of RASSF2 in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 99: 958-966, 2008.
56. Sudbo J: Novel management of oral cancer: a paradigm of predictive oncology. *Clin Med Res* 2: 233-242, 2004.
57. Fong D, Spizzo G, Gostner JM, *et al*: TROP2: a novel prognostic marker in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Mod Pathol* 21: 186-191, 2008.
58. Mullis TC, Tang X and Chong KT: Expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 61: 606-610, 2008.
59. Kumar SV, Hurteau GJ and Spivack SD: Validity of messenger RNA expression analyses of human saliva. *Clin Cancer Res* 12: 5033-5039, 2006.
60. Zhong LP, Zhu HG, Zhang CP, *et al*: Detection of serum Cyfra 21-1 in patients with primary oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 36: 230-234, 2007.
61. Zhong LP, Zhang CP, Zheng JW, *et al*: Increased Cyfra 21-1 concentration in saliva from primary oral squamous cell carcinoma patients. *Arch Oral Biol* 52: 1079-1087, 2007.
62. Bahar G, Feinmesser R, Shpitzer T, *et al*: Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. *Cancer* 109: 54-59, 2007.
63. Landesberg R, Woo V, Huang L, *et al*: The expression of the receptor for glycation endproducts (RAGE) in oral squamous cell carcinomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 105: 617-624, 2008.
64. Epstein JB, Zhang L and Rosin M: Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J Can Dent Assoc* 68: 617-621, 2002.

Exfoliative cytology for diagnosing oral cancer

M Pérez-Sayáns, JM Somoza-Martín, F Barros-Angueira, MD Reboiras-López,
P Gándara-Vila, JM Gándara Rey, A García-García

School of Dentistry, Entrerriós s/n, Santiago de Compostela C.P. 15782, Spain

Accepted June 22, 2009

Abstract

Exfoliative cytology is a minimally invasive technique for obtaining oral cell specimens from patients for diagnostic purposes. Classical applications of oral cytology studies, such as oral candidiasis, have been extended to include oral precancerous and cancerous lesions. A number of analytical methods are available for studying cytology specimens. The development of molecular analysis techniques, the oral cancer etiopathogenic process, and improvements in liquid-based exfoliative cytology are leading to renewed interest in exfoliative cytology. Results sometimes are disputed, so the aim of our review was to clarify the applicability of exfoliative cytology to the diagnosis of oral precancerous and cancerous lesions.

Key words: *liquid-based cytology, molecular analysis, oral cancer, oral cytology, quantitative cytomorphology*

Classical diagnostic methods for precancerous and cancerous oral lesions include clinical examinations and histopathological studies of biopsied material (Acha et al. 2005, Hullmann et al. 2007). Obtaining a sample by biopsy is invasive and involves both technical difficulties and psychological implications for the patient. When the lesions are extensive, the most representative areas must be selected to avoid diagnostic errors. Biopsy has poor sensitivity owing to the subjectivity of the pathologist (Epstein et al. 2002).

It is important to simplify diagnostic techniques to enhance their reliability and to reduce their invasiveness to improve diagnosis and follow-up for patients with precancerous and cancerous oral lesions. In recent times we have witnessed a growing interest in different kinds of oral cytology methods (Acha et al. 2005).

Concept

Exfoliative oral cytology is the study and interpretation of the characteristics of cells that flake off, whether naturally or artificially, from the oral mucosa. After the cells have been collected, fixed and stained, the morphology of surface epithelial cells is observed under a microscope (Langlois et al. 1993). The technique is simple, non-aggressive, relatively painless and tolerated well by patients (Driemel et al. 2007). It can be used for diagnosis of predictive methodology and identification of recurrent oral squamous cell carcinoma (SCC) (Moralis et al. 2007).

Papanicolaou and Traut (1941) first demonstrated the validity of cytology for diagnosing neoplasms of the uterine cervix. Oral cytology soon came to be used for diagnosis of diseases of the oral cavity, although with little success (Sandler 1963). The presence of histological changes in the oral mucosa (lining, and special masticatory mucosa) sometimes creates difficulties for diagnostic pathologists who do not specialize in oral tissues.

Cells are obtained from the oral cavity using physical procedures such as surface scraping or brushing, rinses, or saliva specimens. The gold standard is exfoliation by mechanical separation of epithelium using different instruments to which

Correspondence: Mario Pérez-Sayáns, DDS, Facultad de Odontología, Entrerriós s/n, Santiago de Compostela C.P. 15782, Spain. Tel: 0034626233504. Fax: 0034986295424. e-mail: perezsayans@gmail.com

© 2009 Biological Stain Commission

Biotechnic & Histochemistry 2009, 1–11, iFirst article.

the term, exfoliative cytology, alludes (Chandler 1966). To obtain oral cells with brushes, we can whisk with a moderately stiff brush (may not reach the basal cells) and the “cytobrush,” which gently excavates down to some of the basal cells. The presence of basal cells is important to RNA collection and analysis, and for diagnostic accuracy.

A number of studies have been undertaken to evaluate the use of different instruments for obtaining cytology specimens (Ogden et al. 1992, Jones et al. 1994, Navone et al. 2008). The basic requirements for a useful technique are that it is easy to use, minimizes patient discomfort and collects sufficient cells (Jones et al. 1994). Most of these studies concluded that the brush is suitable for obtaining a sufficient number of good quality cells (Driemel et al. 2007). It appears that sampling with dermatological curettes, however, yields better quality and larger amounts of cellular and molecular material for cytopathological study (Fig. 1) (Navone et al. 2008).

Despite improvements in sampling, exfoliative cytology has a high false negative rate because of nonrepresentative sampling and individual subjectivity (Nichols et al. 1991). Liquid-based cytology is an improvement toward resolving this problem and is discussed further below (Hayama et al. 2005, Navone et al. 2007). In brush biopsies, samples are collected using special brushes that penetrate the lesions to ensure that representative material is obtained. The aim is to collect both surface and basal cells, which make the sample more representative (Jones et al. 1994). Evaluation is either visual or computer-assisted (Sciubba 1999). This technique, however, should complement the biopsy, not replace it. Acha et al. (2005), for

example, believe that the term, brush biopsy, should be replaced by the term, oral brush cytology.

Classical applications of oral cytology studies, such as oral candidiasis, have been extended to include epithelial infection in oral hairy leukoplakia lesions associated with the Epstein-Barr virus (Walling et al. 2003). The percentage of apoptotic cells also has been measured in cytological studies of the saliva of patients treated for oral SCC (Cheng et al. 2004) and could be useful for monitoring reactions to chemotherapy. Remmerbach et al. (2003b) defended both the usefulness of cytology for diagnosing suspect lesions and the routine application of the AgNOR (nucleolar organizer regions) analysis to determine the nucleolar activity of oral cancer.

Liquid-based cytology

Exfoliative cytology in the form of the cytological smear originally was used for early detection of cancerous cervical cells. Smears also have been used to diagnose certain kinds of oral lesions, mostly in diseases caused by a virus or fungus. Developments in cytology have led to the use of liquid-based preparations, which has stimulated new interest in this method for assisting in the diagnosis of oral mucosa lesions (Sugerman and Savage 1996). In liquid-based cytology, the specimen and the collection device are placed in a receptacle containing a preservative fluid, which generates a suspension of cells that subsequently are deposited as a thin layer on a slide. The technique produces preparations consisting of abundant cells dispersed in a thin, homogenous layer. Blood, pus and mucus are reduced and distributed throughout the preparation. The clear background that results enhances sample sensitivity and quality (Linder and Zahniser 1997, Nasuti et al. 2001).

Compared to conventional smears, liquid-based cell preparations reduce the number of unsatisfactory or “satisfactory-but-limited-by” preparations and this reduces the number of false negative results (Bishop et al. 1998).

Cytological analysis

Cytology specimens can be studied using quantitative cytomorphology, nuclear DNA content analysis, immunohistochemical tumor marker identification or molecular analysis.



Fig. 1. Curette sampling is carried out on the entire surface area of the lesion including those with a low suspicion index. From Navone et al. (2008).

Quantitative cytomorphology

Several authors have suggested that quantitative techniques that are objective, accurate, reproducible and based on evaluation of parameters such as variations in the size of the nucleus and cytoplasm, and alterations in the nucleus:cytoplasm ratio may enhance the diagnostic sensitivity of exfoliative cytology for early diagnosis of oral cancer (Fig. 2) (Ogden et al. 1997).

Cowpe et al. (1985) demonstrated that exfoliative cytology can detect malignant changes by determining the area of the nucleus and cytoplasm in Papanicolaou stained smears. Their study was based on calculating the areas of the nucleus and the cytoplasm using the planimeter method, and the nucleus:cytoplasm ratio for cells taken from the oral cavity. They concluded that 50 cells were sufficient to provide a coherent evaluation of various locations in the oral cavity. They found that a reduction in the cytoplasmic area preceded an increase in the area of the nucleus in tissues developing malignancy. In another study, these investigators suggested that in the absence of normal cytology values, the healthy mucosa of the same patient could serve as a satisfactory control (Cowpe et al. 1988). More recent studies have been based on this technique to evaluate the influence of several systemic and external factors on the parameters to be measured. The planimeter has been replaced by semi-automated image-based analytical methods that are faster, more accurate and ensure better reproducibility (Cowpe et al. 1985, 1993).

Ramaesh et al. (1998) used cytometric techniques to determine the diameters of the nuclei and



Fig. 2. Quantitative cytomorphology. Nuclear and cytoplasmic measurements of Papanicolaou stained oral epithelial cells. From Freitas et al. (2004).

cytoplasm of cells from normal oral mucosa, dysplastic lesions and oral SCC. They found that the cytoplasm diameter was reduced progressively from normal mucosa cells to lesions with greater dysplasia and was smallest in oral SCC lesions. The opposite was true for nuclear diameters; they increased progressively from normal mucosa cells to lesions with greater dysplasia and were the greatest in oral SCC lesions.

Nuclear DNA content analysis

Static quantitative cytomorphology allows DNA content to be quantified for cells obtained by exfoliative cytology. Nonetheless, routine hematoxylin and eosin staining is inappropriate for analysis of DNA content, so special stains are needed to ensure that the quantity of DNA is proportional to the quantity of the stain. The Feulgen reaction meets this criterion, because it is a stoichiometric staining procedure in theory, each molecule stained with Schiff reagent corresponds to a constant and equivalent portion of the DNA molecule. This could make it possible to determine the quantity of DNA contained in the different cells in the sample. The great advantage of the procedure is that the information can be objectified by using spectrophotometric or digital analysis of images obtained using DNA densitometry (García del Moral et al. 1993).

Cowpe et al. (1985) demonstrated that clinically normal mucosa in healthy patients has a diploid DNA profile, whereas an abnormal profile is associated with malignancy. Nonetheless, while most oral malignant lesions have abnormal DNA profiles, some, in fact, are diploid.

The combination of DNA content quantification with nuclear and cytoplasm morphometry seems to be the best approach to distinguishing pre-malignant from malignant lesions.

Immunohistochemical tumor marker identification

Determining tumor marker expression in cells exfoliated from the oral cavity has raised considerable interest and the expression of cytokeratins has received special attention. The cytokeratin expression pattern provides useful information about the state of cell differentiation (Lane and Alexander 1990), but its diagnostic potential for early detection of oral cancer is limited, because there is no keratin marker in the malignant lesions that is not present also in normal oral mucosa (Ogden et al. 1993). Identification of some

cytokeratins, however, such as keratins 8 and 19 (Ogden et al. 1993), may represent an important indicator of a malignant lesion, particularly if associated with other markers (Ogden et al. 1994). According to Bongers et al. (1996), identifying cytokeratins 16 and 19 allows early changes in the cancer development process to be detected, so these cytokeratins could be used for screening or monitoring possible secondary tumors.

Kujan et al. (2006) demonstrated the usefulness of liquid-based cytology specimens for determining immunocytochemically the fragile histidine triad as a molecular marker for oral cancer.

Mutation of the tumor suppressor gene p53 is one of the most frequent genomic changes in human cancers. According to most studies, p53 is not detected in normal oral mucosa, but it can be demonstrated immunohistochemically in oral SCC and in potentially malignant lesions of the oral mucosa. It also has been identified in malignant tumor cells obtained using exfoliative cytology, but not in normal mucosa (Freitas et al. 2004). Mutation of p53 occurs in only 50% of oral SCC cases. Furthermore, p53 expression in oral tumors is detected only at advanced stages of carcinogenesis. Exfoliative cytology aimed at p53 detection cannot determine tumors at an early stage, because this technique is inappropriate for obtaining basal cell samples from intact epithelium (Ogden et al. 1992, 1996).

Recently, Szelachowska et al. (2008) found that an increase in metallothioneins detected by immunohistochemistry is associated with poor tumor prognosis; however, these investigators did not find a relationship with proliferative activity.

It appears that the histo-blood group antigen H (ABH) type 2 chain, even more than the cytokeratins, is an excellent marker for monitoring premalignant lesions or for following up malignant lesions (Bongers et al. 1996). The main difficulty is that there is no single marker present in all the malignant lesions that is not present also in benign lesions and normal oral mucosa (Ogden et al. 1997).

Molecular analysis

Recent interest in studying cytology applied to oral cancers has arisen because of the application of innovative molecular techniques. Genetic analysis of molecular markers permits alterations to be detected prior to clinical manifestations and changes in cell morphology (Epstein et al. 2002). According to Driemel et al. (2008), the use of exfoliative cytology and classical morphological analysis using

hematoxylin and eosin is insufficiently sensitive. When combined with molecular techniques, however, the results are more predictive and can be used not only for diagnosis but also to monitor patients (Mehrotra et al. 2006). Classical cytological analysis requires substantial experience to determine pathologies, whereas molecular analysis is more objective in terms of identifying specific genetic anomalies in both the oral cavity (Spafford et al. 2001) and the cervix (Steinau et al. 2005).

The possibility of extracting RNA from exfoliated cells was demonstrated recently and created interest in the approach for early diagnosis of oral premalignant and cancerous lesions. Establishing the validity of these measurements for quantifying gene expression remains a major objective (Schwartz et al. 2008). Analysis of RNA in saliva has the advantage that the sample is obtained easily. It has the disadvantage, however, that it does not provide direct measurement of tissue gene expression (Ballantyne 2007), because it measures stable RNA extracellularly and identifies markers derived from the disease itself, but not the etiology of the disease (Brinkman and Wong 2006). Analysis of RNA obtained by exfoliative cytology has the advantage of enabling live cells to be isolated from sites at risk of disease. Early changes in the progression of the disease that affect gene expression can be detected with a minimally invasive technique. There are two potential problems, however: the contribution to the RNA sample of dead or nearly dead cells and differences in sampling that accentuate differences in the type and number of isolated cells (Schwartz et al. 2008). Pilot studies have demonstrated that RNA isolation based on exfoliative cytology is possible and that messenger RNA can be detected using quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) microarray analysis (Steinau et al. 2005, Spivack et al. 2004, Smith et al. 2006).

Although isolation of DNA from epithelial cells has been demonstrated in several studies, isolation of RNA has not been validated to the same degree because of the ribonucleases in saliva that rapidly degrade cellular RNA during collection. Spira et al. (2004) were the first to analyze RNA obtained from the oral mucosa using PCR and mass spectrometry.

In their analyses of gene expression in cytology specimens, Spivack et al. (2004) also proposed using RNA obtained by exfoliative cytology to determine susceptibility to cancer among healthy populations, detect early markers of carcinogenesis and evaluate the efficacy or toxicity of chemopreventative and chemotherapeutic agents.

Cytological molecular markers

Cancer is considered a process resulting from the accumulation of many alterations, typically acquired (somatic), but occasionally inherited. The activation of proto-oncogenes, the inactivation of tumor suppressor genes and the involvement of DNA repair enzymes cause the neoplastic transformation (Acha et al. 2005).

The most important oral carcinogens include chemical (tobacco), physical (radiation) and infectious agents (papillomavirus, *Candida*), which, as mutagens, can cause changes in the genetic and chromosomal structure in the form of point mutations, deletions, insertions or rearrangements (Boyd and Reade 1988). These alterations can be used as diagnostic and therapeutic targets (Spafford et al. 2001, Ogden et al. 1991, Boyle et al. 1994).

As mentioned above, mutations of the p53 tumor suppressor gene are the most frequently occurring genetic alterations in human cancers and also are variables in oral cancer. Given the large number of such mutations that might occur, the detection of point mutations in p53 as a specific marker for oral SCC does not appear to be very useful (Boyle et al. 1994, Scheifele et al. 2002).

Epigenetic alterations (promotor hypermethylation), genomic instability and loss of heterozygosity (LOH) (Fig. 3), microsatellite instability (MSI) (El-Naggar et al. 2001, Rosas et al. 2001) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Huang et al. 1999) are other molecular markers that are used.

The main epigenetic alteration in tumors is methylation Rosas et al. (2001). Often associated with loss of genetic expression, it contributes to tumor progression by inactivating DNA repair genes. Hypermethylation of the normally unmethylated CpG islands located in gene promoter regions can be determined by using exfoliative cytology (Baylin et al. 1998). Rosas et al. (2001) studied methylation patterns for the p16, MGMT and DAP-K genes in carcinomas and saliva samples and detected aberrant hypermethylation patterns in both kinds of specimens using methylation-specific PCR. They concluded that the technique was highly sensitive for detecting tumor DNA and for evaluating recurrences. Martone et al. (2007) confirmed these results by determining hypermethylated patterns in surgical margins with no histological evidence of malignancy.

Califano et al. (1996) studied microsatellite markers and demonstrated that alterations of

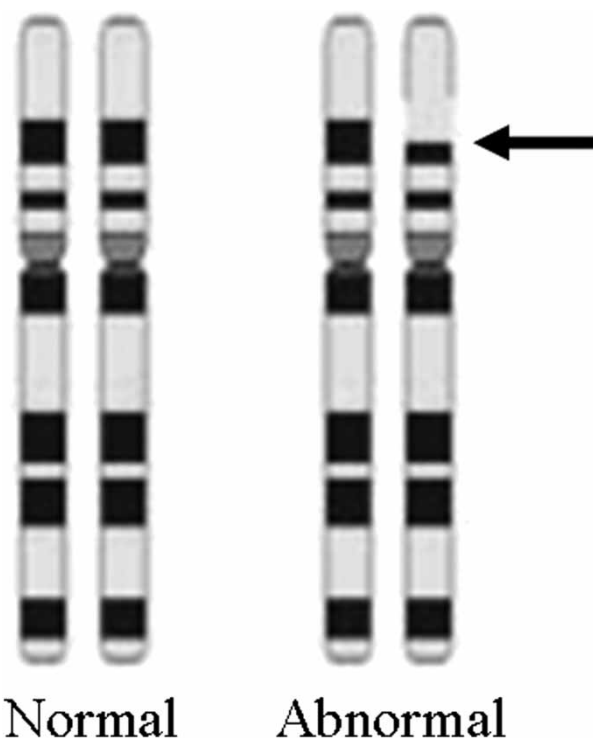


Fig. 3. Loss of heterozygosity showing loss of chromosomal region containing tumor suppressor genes (arrow). Adapted from Epstein et al. (2002).

specific regions of chromosomes 3p, 9p, 17p and 18q are associated with head and neck SCC. Alterations in the microsatellite regions are used as clonal markers and for detecting tumor cells (Sidransky 1995). Analysis of these regions can reveal LOH and MSI (Spafford et al. 2001, Okami et al. 2002). Huang et al. (1999) used PCR to amplify DNA for cells obtained by exfoliative cytology for analysis of RFLP in oral carcinomas. PCR and RFLP analysis also were used to evaluate microsatellite markers, which are small repeated sequences of DNA. The genetic mutations, LOH and MSI, are characteristic of head and neck SCC and can be used as molecular markers of malignancy. Nunes et al. (2000), in a microsatellite analysis of cells collected from the oral cavity using exfoliative cytology and mouth rinsing, identified LOH in 84% of the cases studied, although identification of the alterations was independent of tumor stage. They suggested that the technique could be useful for early diagnosis and for following patients with oral cancer.

More recently, Driemel et al. (2007) studied extracellular matrix molecule expression in cytology specimens and observed messenger RNA expression for laminin-5 and tenascin-C in oral SCC. The usefulness of this technique for early

detection of oral SCC is disputed, however (Fist 2003) (Fig. 4). Some studies suggest that the false positives demonstrate high sensitivity (90%), but low specificity (3%) (Rick 2003).

Remmerbach et al. (2001) analyzed DNA-image cytometry to determine the reliability of cytology for early diagnosis of oral cancer, and obtained sensitivity and specificity values of 94.6% and 99.5%, respectively. Sensitivity and specificity for DNA-anueploidy were 96.4% and 100%, respectively. The combination of both techniques increased the positive and negative predictive values to 100% and 99.5%, respectively. Potter et al. (2003) found four false negatives among 115 cases analyzed; although this level of false negatives was low, the average time to diagnosis was 117.25 days.

Detection of dysplasia using cytology has been studied widely. According to Warnakulasuriya et al. (2008), there is great inter- and intra-examiner variability in assessment of the presence or absence of oral epithelial dysplasia. Because there are many stages of dysplasia, this study endeavoured to standardize dysplasias in an attempt to minimize variability of interpretation (Fig. 5).

Several studies have been undertaken to compare the advantages and applications of liquid-based cytology and conventional exfoliative cytology (Fig. 6). Hayama et al. (2005) found that both techniques gave comparable cytological diagnoses for all cases in which a suitable sample was collected, although hypocellularity in three of

44 conventional smear cases meant that these were unsuitable for analysis. Liquid-based cytology showed statistically significant overall improvement in smear thickness and cell distribution, 41% and 66%, respectively ($p \leq 0.05$), and also reduced cell overlap and less blood ($p \leq 0.05$). Cell morphology also could be visualized better in the liquid-based preparations (Hayama et al. 2005).

Navone et al. (2007) used dermatological curettes and a liquid base to augment the amount of material obtained by sampling. Only 8.8% of the samples were inadequate among the liquid-based cytology group compared to the conventional smear group. The liquid-based cytology group produced a sensitivity of 95.1% and a specificity of 99.0%. These investigators concluded that liquid-based cytology not only improved sensitivity and specificity for diagnosing malignant lesions, but also permitted suitable material to be obtained for molecular analyses, e.g., AgNOR, DNA or microbiopsy.

Concerning cytometry techniques, although it appears that a reduction in the nucleus and an increase in cytoplasm may be early indicators of malignant change, the results are disputed. Saiz et al. (2005) did not believe that the cellular proliferation index, mitotic index, polyploidy and S-phase parameters could be used as prognostic factors for oral SCC, because no statistically significant differences have been found in the appearance of local recurrence, distant metastasis and survival. Nonetheless, Pektas et al. (2006) demonstrated cell diploidy in 83.3% of malignant lesions, a statistically significant difference compared to the control group. They concluded that quantitative cytomorphology analysis using oral cytology is not only a valuable adjunct to biopsy for identifying premalignant lesions and early stage cancerous oral lesions, but it also is a rapid and minimally invasive procedure that requires no topical or local anesthetic and it has high specificity and sensitivity rates (Pektas et al. 2006). Remmerbach et al. (2001) demonstrated high sensitivity and specificity levels (94.6% and 99.5%, respectively) and positive and negative predictive values (98.1% and 98.5%, respectively) for diagnosing cancerous cells and concluded that DNA cytometry was useful for diagnosing precancerous lesions, carcinoma in situ and invasive carcinomas at all stages.

Doseva et al. (1984) found hypodiploid or hypertetraploid distributions instead of a diploid pattern in smears for leukoplakia and lichen ruber planus that subsequently underwent malignant

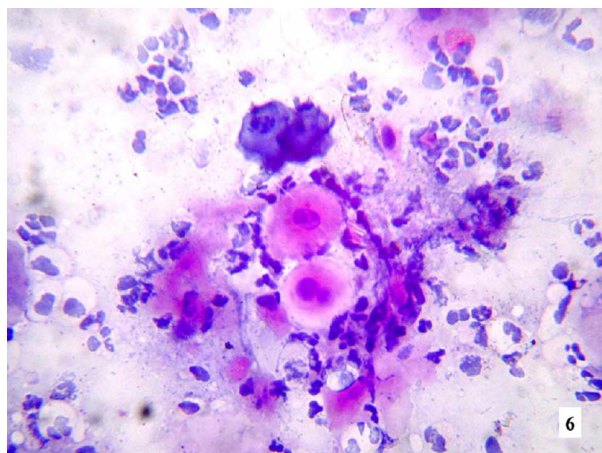


Fig. 4. Oral brush biopsy specimen from a patient with squamous cell carcinoma. Buccal mucosa showing a binucleated cell with evidence of intra-cellular and extra-cellular keratinization against an inflammatory background. Hematoxylin and eosin. $\times 400$. From Mehrota et al. (2006).

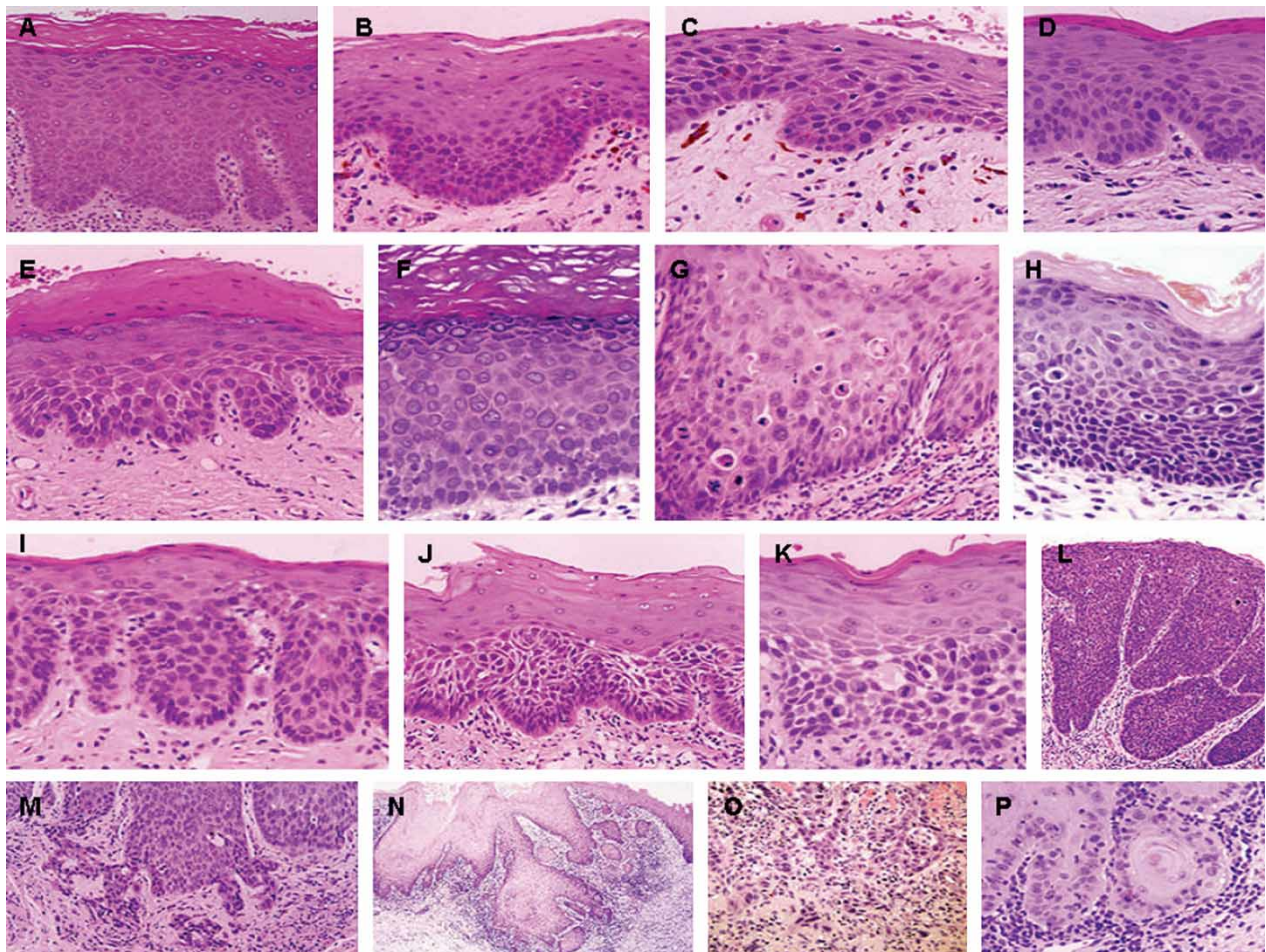


Fig. 5. Classification and grades of dysplasia. Adapted from Warnakulasuriya et al. (2008). A) Squamous epithelium showing keratosis, hyperplasia of stratum spinosum and increased maturation compartment with no changes in architecture. No cellular atypia is present. Grade: no dysplasia. B) Squamous epithelium showing increased basal cells (basal cell hyperplasia) as the only change in architecture. No cellular atypia is present. Grade: no dysplasia. C) Architectural changes are evident in the lower third of the epithelium. Mild cellular atypia is present. Grade: mild dysplasia. D) Architectural changes extend approximately to the lower third of the squamous cell epithelium. Cellular atypia is mild. Grade: mild dysplasia. E) Architectural changes extend to the middle third. Cellular atypia is moderate. Grade: moderate dysplasia. F) Architectural changes into middle third of the epithelium. Cellular atypia is moderate. Grade: moderate dysplasia. G) Architectural changes extend to the upper third of the epithelium. Cellular atypia is marked. Grade: severe dysplasia. H) Architectural changes extend to the upper third of the epithelium. Cellular atypia is marked. Grade: severe dysplasia. I) Architectural changes are severe and extend to the upper third of the epithelium. Cellular atypia, however, is moderate. Grade: moderate dysplasia. J) Architectural changes extend into the middle third of the epithelium and would constitute moderate dysplasia, but in view of marked atypia, moderate dysplasia is upgraded. Grade: severe dysplasia. K) Architectural changes extend to the middle third of the epithelium, but in view of marked cellular atypia, moderate dysplasia is upgraded. Grade: severe dysplasia. L) Architectural changes extend to almost full thickness of the epithelium and marked cellular atypia is clear. Grade: carcinoma in situ. M) Irregular interface between epithelium and connective tissue with pointed projections of epithelium indicates early invasion. N–P) Epithelial islands, possibly separated from the surface epithelium, indicate early invading carcinoma; serial sections may be necessary to confirm invasion.

degeneration. Remmerbach et al. (2003a) found that DNA-aneuploidy as a malignancy marker detected malignancy months in advance of histology. According to Thirthagiri et al. (2007), chromosomal instability, especially at the centrosome level, leads to aneuploidy and aneuploidy leads, in turn, to dysplasia, which

contributes to malignant progression of the tumor. Schimming et al. (1998) assessed the correlation between DNA distribution and clinical and pathological characteristics of oral SCC, and encountered a significantly higher N stage, a greater frequency of metastases and a lower survival rate for non-diploid tumors.

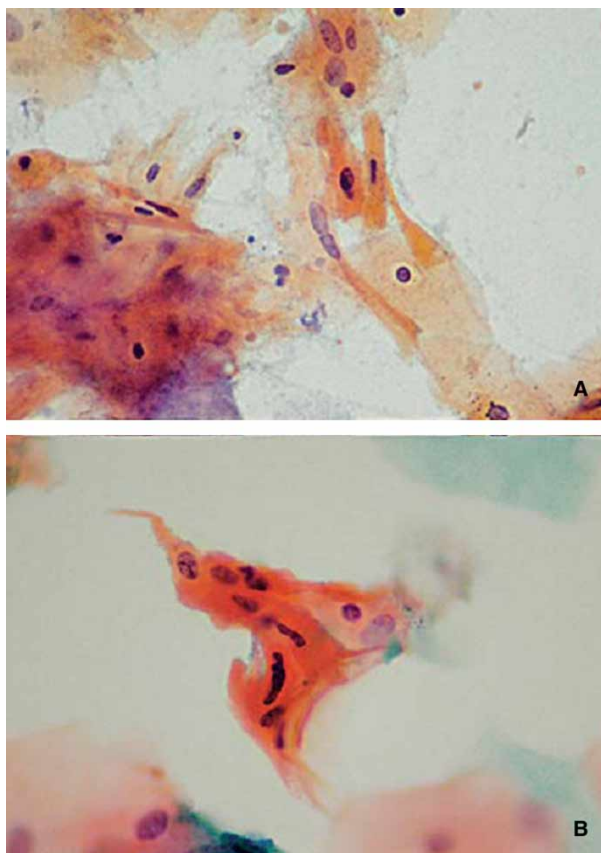


Fig. 6. Squamous cell carcinoma. A) Conventional cytology. Smear background with bacteria; elongated atypical squamous cells. B) Liquid-based cytology. Atypical squamous cell with cellular pleomorphism and nuclear hyperchromasia. Papanicolaou. $\times 400$. From Hayama et al. (2005).

Conclusions

Poor or inadequate cytology (both number and state of cells) may be sufficient cause for excisional biopsy of a small lesion and incisional biopsy of a large lesion to confirm a diagnosis of cancer, to avoid unnecessary therapeutic measures such as hemiglossectomy, radical neck surgery, therapeutic irradiation and chemotherapy. Oral cytology is useful for monitoring several sites of a large lesion and can guide the choice of sites for one or more incisional biopsies. In the same way, it can be used for lesions such as lichen planus, which has a low potential to harbor or develop dysplasia, and sites adjacent to excised premalignant or malignant epithelial lesions. This technique may not be useful for assessing masses arising from or metastatic to the lamina propria or submucosa, because the surface epithelial cells will not give an accurate diagnosis.

Exfoliative cytology with the application of new purely physical and molecular techniques is becoming increasingly important for diagnosis of oral precancerous lesions and cancers. Molecular analysis is likely to become a key technique for diagnosing and managing oral cancers, and the use of molecular markers will permit early diagnosis, identification of changes before these become clinically visible and will permit evaluation of their responses to different treatments. Molecular markers also may prove useful for designing preventative programs.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Acha A, Ruesga MT, Rodriguez MJ, Martinez de Pancorbo MA, Aguirre JM (2005) Applications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and precancer. *Med. Oral. Patol. Oral y Cirugia Bucal.* 10: 95–102.
- Ballantyne J (2007) Validity of messenger RNA expression analyses of human saliva. *Clin. Cancer Res.* 13: 1350–1351.
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP (1998) Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.* 72: 141–196.
- Bishop JW, Bigner SH, Colgan TJ, Husain M, Howell LP, McIntosh KM, Taylor DA, Sadeghi MH (1998) Multicenter masked evaluation of AutoCyte PREP thin layers with matched conventional smears. Including initial biopsy results. *Acta Cytol.* 42: 189–197.
- Bongers V, Snow GB, de Vries N, Braakhuis BJ (1996) Potential early markers of carcinogenesis in the mucosa of the head and neck using exfoliative cytology. *J. Pathol.* 178: 284–289.
- Boyd NM, Reade PC (1988) Mechanisms of carcinogenesis with particular reference to the oral mucosa. *J. Oral Path.* 17: 193–201.
- Boyle JO, Mao L, Brennan JA, Koch WM, Eisele DW, Saunders JR, Sidransky D (1994) Gene mutations in saliva as molecular markers for head and neck squamous cell carcinomas. *Am. J. Surg.* 168: 429–432.
- Brinkman BM, Wong DT (2006) Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Curr. Opin. Oncol.* 18: 228–233.
- Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D (1996) Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* 56: 2488–2492.
- Chandler JR (1966) The nonvalue of oral cytology. *Arch. Otolaryngol.* 84: 527–533.
- Cheng B, Rhodus NL, Williams B, Griffin RJ (2004) Detection of apoptotic cells in whole saliva of patients with oral premalignant and malignant lesions: a

preliminary study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodont.* 97: 465–470.

Cowpe JG, Longmore RB, Green MW (1985) Quantitative exfoliative cytology of normal oral squames: an age, site and sex-related survey. *J. Royal Soc. Med.* 78: 995–1004.

Cowpe JG, Longmore RB, Green MW (1988) Quantitative exfoliative cytology of abnormal oral mucosal smears. *J. Royal Soc. Med.* 81: 509–513.

Cowpe JG, Ogden GR, Green MW (1993) Comparison of planimetry and image analysis for the discrimination between normal and abnormal cells in cytological smears of suspicious lesions of the oral cavity. *Cytopathology* 4: 27–35.

Doseva D, Christov K, Kristeva K (1984) DNA content in reactive hyperplasia, precancerosis, and carcinomas of the oral cavity. A cytophotometric study. *Acta Histochem.* 75: 113–119.

Driemel O, Kosmehl H, Rosenhahn J, Berndt A, Reichert TE, Zardi L, Dahse R (2007) Expression analysis of extracellular matrix components in brush biopsies of oral lesions. *Anticancer Res.* 27: 1565–1570.

Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, von Eggeling F, Muller-Richter U, Kosmehl H, Reichert TE (2007) Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *J. German Soc. Derm.* 5: 1095–1100.

Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, Kleinsasser N, Staudenmaier R, Muller-Richter U, Reichert TE, Kosmehl H (2008) Performance of conventional oral brush biopsies. *HNO* 56: 205–210.

El-Naggar AK, Mao L, Staerckel G, Coombes MM, Tucker SL, Luna MA, Clayman GL, Lippman S, Goepfert H (2001) Genetic heterogeneity in saliva from patients with oral squamous carcinomas: implications in molecular diagnosis and screening. *J. Molec. Diag.* 3: 164–170.

Epstein JB, Zhang L, Rosin M (2002) Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J. Can. Dent. Assoc.* 68: 617–621.

Fist S (2003) The oral brush biopsy: separating fact from fiction. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodont.* 9: 654–655.

Freitas MD, García AG, Abelleira AC, Carneiro JLM, Rey JMG (2004) Aplicaciones de la citología exfoliativa en el diagnóstico del cáncer oral. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* 9: 355–361.

García del Moral R, Quesada MJ, Ruiz Avila I (1993) Histoquímica de proteínas, aminos biógenas y ácidos nucleicos. In: García del Moral R, Ed. *Laboratorio de anatomía patológica*. 1st ed. McGraw-Hill–Interamericana de España, Madrid. pp. 245–263.

Hayama FH, Motta AC, Silva Ade P, Migliari DA (2005) Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. *Med. Oral Patol. Oral y Cirugia Bucal.* 10: 115–122.

Huang ME, Chang YC, Liao PS, Huang TH, Tsay CH, Chou MY (1999) Loss of heterozygosity of p53 gene of oral cancer detected by exfoliative cytology. *Oral Oncol.* 35: 296–301.

Hullmann M, Reichert TE, Dahse R, von Eggeling F, Pistner H, Kosmehl H, Driemel O (2007) Oral cytology: historical development, current status, and perspectives. *Mund-, Kiefer- Gesichtschirurgie* 11: 1–9.

Jones AC, Pink FE, Sandow PL, Stewart CM, Migliorati CA, Baughman RA (1994) The Cytobrush Plus cell collector in oral cytology. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 77: 95–99.

Kujan O, Desai M, Sargent A, Bailey A, Turner A, Sloan P (2006) Potential applications of oral brush cytology with liquid-based technology: results from a cohort of normal oral mucosa. *Oral Oncol.* 42: 810–818.

Lane EB, Alexander CM (1990) Use of keratin antibodies in tumor diagnosis. *Sem. Cancer Biol.* 1: 165–179.

Langlois CC, Devildos LR, Oliveira GL, Aver-Araújo LM, Eds. (1993) *Diagnóstico Histopatológico. Manual de Aulas Práticas*. 3rd ed. Faculdade de Odontologia, UFPel, Pelotas. pp. 25–31.

Linder J, Zahniser D (1997) The ThinPrep Pap test. A review of clinical studies. *Acta Cytol.* 41: 30–38.

Martone T, Gillio-Tos A, De Marco L, Fiano V, Maule M, Cavalot A, Garzaro M, Merletti F, Cortesina G (2007) Association between hypermethylated tumor and paired surgical margins in head and neck squamous cell carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 13: 5089–5094.

Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R (2006) Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Molec. Cancer.* 5: 11.

Moralis A, Kunkel M, Reichert TE, Kosmehl H, Driemel O (2007) Identification of a recurrent oral squamous cell carcinoma by brush cytology. *Mund-, Kiefer- Gesichtschirurgie* 11: 355–358.

Nasuti JF, Tam D, Gupta PK (2001) Diagnostic value of liquid-based (Thinprep) preparations in nongynecologic cases. *Diag. Cytopathol.* 24: 137–141.

Navone R, Burlo P, Pich A, Pentenero M, Broccoletti R, Marsico A, Gandolfo S (2007) The impact of liquid-based oral cytology on the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma. *Cytopathol.* 18: 356–360.

Navone R, Pentenero M, Rostan I, Burlo P, Marsico A, Broccoletti R, Scully C, Gandolfo S (2008) Oral potentially malignant lesions: first-level micro-histological diagnosis from tissue fragments sampled in liquid-based diagnostic cytology. *J. Oral Pathol.* 37: 358–363.

Nichols ML, Quinn FB Jr, Schnadig VJ, Zaharopoulos P, Hokanson JA, Des Jardins L, McCracken MM (1991) Interobserver variability in the interpretation of brush cytologic studies from head and neck lesions. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 117: 1350–1355.

Nunes DN, Kowalski LP, Simpson AJ (2000) Detection of oral and oropharyngeal cancer by microsatellite analysis in mouth washes and lesion brushings. *Oral Oncol.* 36: 525–528.

Ogden GR, Chisholm DM, Adi M, Lane EB (1993) Cytokeratin expression in oral cancer and its relationship to tumor differentiation. *J. Oral Pathol. Med.* 22: 82–86.

Ogden GR, Cowpe JG, Chisholm DM, Lane EB (1994) DNA and keratin analysis of oral exfoliative cytology in

the detection of oral cancer. *Eur. J. Cancer. Part B. Oral Oncol.* 30B: 405–408.

Ogden GR, Cowpe JG, Green M (1992) Cytobrush and wooden spatula for oral exfoliative cytology. A comparison. *Acta Cytol.* 36: 706–710.

Ogden GR, Cowpe JG, Green MW (1991) Detection of field change in oral cancer using oral exfoliative cytologic study. *Cancer* 68: 1611–1615.

Ogden GR, Cowpe JG, Wight AJ (1997) Oral exfoliative cytology: review of methods of assessment. *J. Oral Pathol Med.* 26: 201–205.

Ogden GR, Kiddie RA, Lunny DP, Lane DP (1992) Assessment of p53 protein expression in normal, benign, and malignant oral mucosa. *J. Pathol.* 166: 389–394.

Ogden GR, Leigh I, Chisholm DM, Cowpe JG, Lane EB (1996) Exfoliative cytology of normal oral mucosa. Assessing the basal cell keratin phenotype. *Acta Cytol.* 40: 933–936.

Ogden GR, McQueen S, Chisholm DM, Lane EB (1993) Keratin profiles of normal and malignant oral mucosa using exfoliative cytology. *J. Clin. Pathol.* 46: 352–356.

Okami K, Imate Y, Hashimoto Y, Kamada T, Takahashi M (2002) Molecular detection of cancer cells in saliva from oral and pharyngeal cancer patients. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 27: 85–89.

Papanicolaou GN, Traut HF (1941) The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 121: 211–224.

Pektas ZO, Keskin A, Gunhan O, Karslioglu Y (2006) Evaluation of nuclear morphometry and DNA ploidy status for detection of malignant and premalignant oral lesions: quantitative cytologic assessment and review of methods for cytomorphometric measurements. *J. Oral Maxillofacial Surg.* 64: 628–635.

Potter TJ, Summerlin DJ, Campbell JH (2003) Oral malignancies associated with negative transepithelial brush biopsy. *J. Oral Maxillofacial Surg.* 61: 674–677.

Ramaesh T, Mendis BR, Ratnatunga N, Thattil RO (1998) Cyto-morphometric analysis of squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *J. Oral Maxillofacial Surg.* 27: 83–86.

Remmerbach TW, Weidenbach H, Hemprich A, Bocking A (2003a) Earliest detection of oral cancer using non-invasive brush biopsy including DNA-image-cytometry: report on four cases. *Anal. Cell. Pathol.* 25: 159–166.

Remmerbach TW, Weidenbach H, Muller C, Hemprich A, Pomjanski N, Buckstegge B, Bocking A (2003b) Diagnostic value of nucleolar organizer regions (AgNORs) in brush biopsies of suspicious lesions of the oral cavity. *Anal. Cell. Pathol.* 25: 139–146.

Remmerbach TW, Weidenbach H, Pomjanski N, Knops K, Mathes S, Hemprich A, Bocking A (2001) Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. *Anal. Cell. Pathol.* 22: 211–221.

Rick GM (2003) Oral brush biopsy: the problem of false positives. *Oral Sur. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodont.* 96: 252.

Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG, Wu L, Califano J, Westra W, Jen J, Sidransky D (2001) Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methyl-guanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res.* 61: 939–942.

Saiz Bustillo R, Corchero Martín G, García-Montesinos Perea B, González Terán T, Sánchez Santolino S (2005) Carcinoma oral de células escamosas. Parámetros citométricos de interés pronóstico. *Med. Oral, Patol. Oral y Cirugía Bucal.* 10: 462–467.

Sandler HC (1963) Veterans administration cooperative study of oral exfoliative cytology. *Acta Cytol.* 7: 180–182.

Scheifele C, Schlechte H, Bethke G, Reichart PA (2002) Detection of TP53-mutations in brush biopsies from oral leukoplakias. *Mund-, Kiefer- Gesichtschirurgie* 6: 410–414.

Schimming R, Hlawitschka M, Haroske G, Eckelt U (1998) Prognostic relevance of DNA image cytometry in oral cavity carcinomas. *Anal. Quant. Cytol. Histol./Internat. Acad. Cytol. Am. Soc. Cytol.* 20: 43–51.

Schwartz JL, Panda S, Beam C, Bach LE, Adami GR (2008) RNA from brush oral cytology to measure squamous cell carcinoma gene expression. *J. Oral Pathol. Med.* 37: 70–77.

Sciubba JJ (1999) Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. Computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. U.S. Collaborative OralCDx Study Group. *J. Am. Dent. Assoc.* 130: 1445–1457.

Sidransky D (1995) Molecular markers in cancer diagnosis. *J. Nat. Cancer Inst. Monogr.* 17: 27–29.

Smith RV, Schlecht NF, Childs G, Prystowsky MB, Belbin TJ (2006) Pilot study of mucosal genetic differences in early smokers and nonsmokers. *Laryngoscope* 116: 1375–1379.

Spafford ME, Koch WM, Reed AL, Califano JA, Xu LH, Eisenberger CF, Yip L, Leong PL, Wu L, Liu SX, Jeronimo C, Westra WH, Sidransky D (2001) Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells by microsatellite analysis. *Clin. Cancer Res.* 7: 607–612.

Spira A, Beane J, Schembri F, Liu G, Ding C, Gilman S, Yang X, Cantor C, Brody JS (2004) Noninvasive method for obtaining RNA from buccal mucosa epithelial cells for gene expression profiling. *BioTechniques* 36: 484–487.

Spivack SD, Hurteau GJ, Jain R, Kumar SV, Aldous KM, Gierthy JF, Kaminsky LS (2004) Gene-environment interaction signatures by quantitative mRNA profiling in exfoliated buccal mucosal cells. *Cancer Res.* 64: 6805–6813.

Steinau M, Lee DR, Rajeevan MS, Vernon SD, Ruffin MT, Unger ER (2005) Gene expression profile of cervical tissue compared to exfoliated cells: impact on biomarker discovery. *BMC Genomics* 6: 64.

Sugerman PB, Savage NW (1996) Exfoliative cytology in clinical oral pathology. *Austral. Dent. J.* 41: 71–74.

Szelachowska J, Dziegiel P, Jelen-Krzyszewska J, Jelen M, Tarkowski R, Wlodarska I, Spytkowska B, Gisterek I, Matkowski R, Kornafel J (2008) Prognostic significance of nuclear and cytoplasmic expression of metallothioneins as related to proliferative activity in

squamous cell carcinomas of oral cavity. *Histol. Histopathol.* 23: 843–851.

Thirthagiri E, Robinson CM, Huntley S, Davies M, Yap LF, Prime SS, Paterson IC (2007) Spindle assembly checkpoint and centrosome abnormalities in oral cancer. *Cancer Lett.* 258: 276–285.

Walling DM, Flaitz CM, Adler-Storthz K, Nichols CM (2003) A non-invasive technique for studying oral

epithelial Epstein-Barr virus infection and disease. *Oral Oncol.* 39: 436–444.

Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E (2008) Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J. Oral Pathol. Med.* 37: 127–133.



Contents lists available at ScienceDirect

Cancer Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/canlet



Mini-review

Multidrug resistance in oral squamous cell carcinoma: The role of vacuolar ATPases

Mario Pérez-Sayáns^{a,*}, José Manuel Somoza-Martín^{b,1}, Francisco Barros-Angueira^{c,2},
José Manuel Gándara Rey^{b,3}, Abel García-García^{b,4}

^a Oral Medicine, Oral Surgery and Implantology Unit, Faculty of Medicine and Dentistry, Entreríos s/n, Santiago de Compostela CP 15782, Spain

^b Entreríos s/n, Santiago de Compostela CP 15782, Spain

^c Unidad de Medicina Molecular – Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica. Edificio de Consultas planta -2. Hospital Clínico Universitario, CP 15706, Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 November 2009

Received in revised form 23 March 2010

Accepted 25 March 2010

Available online xxxx

Keywords:

Multidrug resistance

Oral squamous cell carcinoma

MDR

P-glycoprotein

V-ATPase

ABSTRACT

Resistance to chemotherapy agents is the main reason for treatment failure in patients with cancer. Multidrug resistance (MDR) is the primary mechanism that leads to the acquisition of the multiresistant phenotype through the overexpression of drug efflux transporters such as the P-glycoprotein (Pgp), encoded by the *MDR1* gene, at the plasma membrane. Other molecules that have been implicated in drug resistance include multidrug resistance-associated proteins, glutathione *S*-transferase- π , and DNA topoisomerase II. These molecules, however, cannot fully explain MDR in oral squamous cell carcinoma. Vacuolar ATPase (V-ATPase), which is largely responsible for regulating acidity in the microenvironment of solid tumors (and hence interfering with the absorption of chemotherapy drugs), seems to be the most important molecule involved in MDR in such tumors. Specific V-ATPase inhibitors, thus, may be useful, not only as coadjuvants in antitumor treatments but also as a mechanism for controlling resistance to antitumor drugs.

© 2010 Published by Elsevier Ireland Ltd.

1. Introduction

Resistance to chemotherapy agents is the main reason for treatment failure in patients with cancer, and multidrug resistance (MDR) occurs in many types of tumors. The main mechanism that gives rise to the MDR phenotype is the overexpression of drug efflux transporters such as the P-glycoprotein (Pgp) in the plasma membrane [1].

Extracellular pH is considerably more acidic in oral squamous cell carcinoma (OSCC), a solid tumor, than in normal tissue. This increased acidity interferes with the absorption of standard chemotherapy drugs, reducing their effect on tumors [2,3]. Vacuolar ATPases (V-ATPases) have been reported to be largely responsible for this acidic environment [4,5].

While a clear association has been established between MDR and Pgp expression in some tumors, the mechanism by which drug resistance occurs within the multistep process of OSCC has not yet been fully elucidated [6]. OSCC is highly resistant to a wide range of structurally different drugs with diverse cytotoxic mechanisms of action [7]. This suggests that OSCC may be intrinsically chemoresistant and it is possible that V-ATPases play a key role in this resistance [8].

The aim of this review is to describe MDR in OSCC, analyze the main genes involved, and investigate the role of V-ATPases as a possible drug resistance mechanism.

* Corresponding author. Tel.: +34 626233504; fax: +34 986295424.
E-mail addresses: perezsayans@gmail.com (M. Pérez-Sayáns), cinolo@gmail.com (J.M. Somoza-Martín), francisco.barros@usc.es (F. Barros-Angueira), josemanuel.gandara@usc.es (J.M.G. Rey), abel.garcia@usc.es (A. García-García).
¹ Tel.: +34 619099006.
² Tel.: +34 981951490.
³ Tel.: +34 639814869.
⁴ Tel.: +34 606461881.

2. MDR and Pgp

MDR is a process in which cells acquire simultaneous resistance to a group of drugs that appear to be unrelated structurally and functionally. It has been estimated that resistance to chemotherapy contributes to over 90% of deaths due to cancer [9]. A close association has been established between MDR and plasma membrane levels of Pgp-a 170 kDa phosphoglycoprotein encoded by the *MDR1* gene [10,11]. Pgp is a member of the ATP-binding cassette superfamily of protein transporters [12] (Fig. 1). It behaves as a unidirectional ATP-dependent pump that allows tumor cells to evade the toxic effects of lipophilic drugs [13,14]. This behavior is similar to that of copper efflux transporters, such as ATP7B, which have been found to contribute to the acquisition of cisplatin resistance in OSCC cell lines [15].

This is not, however, apparently the only survival mechanism used by cancer cells. A cooperative response between MDR and detoxification enzymes such as glutathione S-transferase (GST), for example, has also been identified [16], confirming the hypothesis that carcinogens administered in low doses over long periods of time may target transformed cells that are actually insensitive to the cytotoxic effects of these carcinogens [17]. Carcinogenesis and the MDR phenotype appear to be closely linked. Indeed, the transformation of liver cells with activated

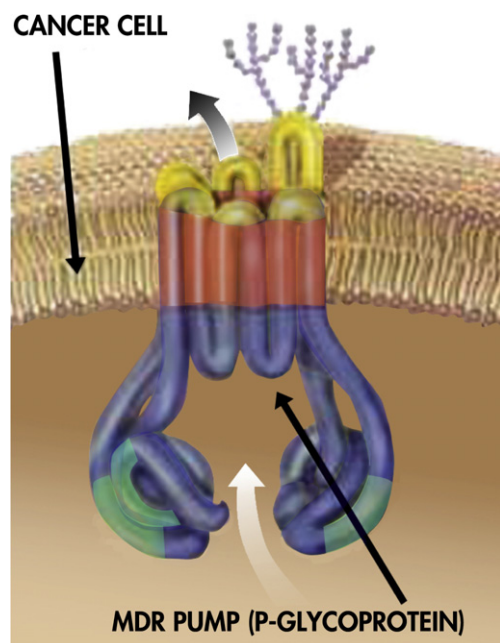


Fig. 1. Pgp resides in the cell membrane, where it may act to pump toxins out of the cell. The painting shows a model of the protein's structure that is based on its known sequence of amino acids. The protein chain is thought to snake back and forth 12 times across the lipid bilayer of the membrane forming a 12-sided pore. The part of the protein outside the cell bears sugar chains (purple); two large and nearly identical domains protrude into the cell. They include regions (green) that bind the cellular energy-carrying compound ATP, which probably provides the energy that drives the efflux (arrows) [107]. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.).

oncogenes has been found to give rise to an increase in *MDR1*, Pgp and GST products, and, in turn, an increase in MDR, in comparison to normal cells [18].

The role of Pgp in the mediation of the drug-resistance phenotype in MDR cells is well documented [6]. It acts as an energy-dependent drug efflux pump and has been consistently found in different MDR cell lines. Pgp expression levels have been correlated with degree of drug resistance, with low levels found in drug-sensitive cells [19]. The viral transfection of drug-sensitive cells (resulting in the overexpression of Pgp genes) has been shown to give rise to MDR. Pgp is found in normal tissue, with maximum levels found in the adrenal glands, the kidney, the intestinal mucosa, and the liver. The presence of Pgp at these sites suggests that these glycoproteins are involved in normal detoxification and transport of lipophilic molecules. Pgp is not found in normal oral mucosa [20–23].

It has been demonstrated that Pgp can be induced by treatment with antitumor agents, possibly explaining the progressive resistance observed following repeated cycles of chemotherapy [15,24] and radiotherapy [25,26]. Previous studies have demonstrated that radiotherapy delivered before chemotherapy induces high levels of Pgp (independently of p53 levels [27], resulting in poor chemotherapy response [28].

As has already been mentioned, there is a close relationship between MDR and the malignant phenotype. Pgp overexpression has been significantly correlated with both growths at the leading edge of tumors in colon carcinoma and tumor aggressiveness [29]. *MDR1* levels, in turn, have been related to activated p53 in an experimental model [30], and an association between the N-myc oncogene and multidrug resistance-associated protein (MRP) expression levels has been shown in the malignant phenotype of neuroblastoma [31,32]. In renal cell carcinoma, a relationship has been found between the expression of several resistance-related proteins (namely, Pgp, GST- π , and topoisomerase II) and proto-oncogene expression [33,34]. Finally, Pgp overexpression has been associated with poor chemotherapy response in numerous cases including acute myeloid leukemia, childhood tumors (sarcomas), regional involvement in breast cancer [35], hematologic malignancies [36], solid tumors [37] and tumors derived from the kidney [38], pancreas, and adrenal glands [39].

3. MDR in OSCC

The accumulation of genetic alterations in oncogenes and tumor suppressor genes has been associated with the multistep process that characterizes the development of oral cancer [40]. As already mentioned, while a clear association has been established between MDR and Pgp expression in certain tumors, the mechanism by which drug resistance occurs within the multistep process of OSCC has not yet been fully elucidated [41]. It is therefore necessary to investigate the relationship between the mechanisms of carcinogenesis, cancer progression, and the development of MDR in experimental models [24].

Several genes have been implicated in MDR, including *MDR1*, *MRP*, *GST- π* , and *DNA topoisomerase II*.

Pgp is encoded by *MDR1* and flow cytometry studies have shown increased Pgp levels in recurrent OSCCs compared to normal mucosa with oral lesions at different stages of tumorigenesis [42]. These findings were confirmed by immunohistochemical staining in a study that compared recurrent tumors with untreated primary oral tumors [43,44]. Ralhan et al. [45] found that Pgp expression increased with increasing severity of dysplasia. In the same study, Pgp levels were also markedly increased in recurrent tumors compared to primary tumors, leading the authors to suggest that differential Pgp expression might be a prognostic marker for oral cancer in the Indian population (Fig. 2).

The best known *MDR1* gene product is Pgp/P-170, which has been implicated in resistance to chemotherapy agents such as taxanes, anthracyclines, vinca alkaloids, podophyllotoxins, and camptothecins [11]. An immunohistochemical study by Lo Muzio et al. [46] confirmed P-170 positivity in normal cells in patients that smoked and in differentiated areas of neoplasia. The authors also found negativity and zonal positivity in undifferentiated tumor areas, suggesting that the activation of the *MDR1* gene or the intrinsic selection of MDR neoplastic cells possibly occurs in the early stages of oral tumorigenesis, before there are any true signs of cell transformation [46,47].

The mechanism by which Pgp-mediated MDR is acquired in head and neck tumors, however, is different. Immunohistochemical studies, for example, have revealed high levels of Pgp in salivary gland adenocarcinoma (SGA) cell lines but insignificant levels in OSCC cell lines [48]. Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction analysis of *MDR1* expression has also revealed increased Pgp levels in different cell lines treated with vincristine (alkaloid cancer drug). These results suggest that Pgp-induced MDR in OSCC is essentially an acquired phenotype caused by the genetic induction of Pgp [49].

MRP has been linked to MDR in multidrug resistant Pgp-negative cells lines in small cell lung cancer, cancer of the stomach, bladder, cervix, and prostate, and leukemia [50–53]. In head and neck tumors, overexpression of MRP1 mRNA has been found in human and murine OSCC and SGA cell lines mice treated with vincristine. In the case of MRP7, vincristine-induced mRNA and protein have also been found in SGA cell lines in mice and humans. In vivo stud-

ies, MRP7 has been found to be overexpressed in human SGA xenografts but not in human OSCC cell lines, particularly in response to docetaxel [48]. These findings support the theory of Pgp- and MRP-independent MDR in OSCC.

Overexpression of the isozyme GST- π is often associated with malignant transformation and/or MDR [54]. GST- π is responsible for detoxifying xenobiotics such as carboplatin (used in chemotherapy) and elevated levels of this enzyme cause treatment resistance [55,56]. Whether or not this is also the case in OSCC, however, is a matter of debate. In a study by Chen et al. [57], GST- π levels increased with increased severity of oral epithelial dysplasia in line with the development of OSCC. The immunohistochemical expression of placental GST- π has been studied in the oral epithelium of premalignant and malignant oral lesions, and has indeed been proposed as a good marker for premalignant lesions and tumors [58]. Another study, however, that analyzed GST- π levels using enzyme-linked immunoassay failed to find a significant relationship between GST- π and TNM stage [59]. Finally, in a study that analyzed GST- π expression using Northern blot analysis and gene amplification with Southern blot analysis, Wang et al. [60] concluded that the amplification of the GST- π gene was not critically related to the overexpression of GST- π mRNA. Furthermore, they found no relationship between GST- π mRNA overexpression and tumor size, neck nodal status, or patient survival.

The downregulation of topoisomerase II – an enzyme that breaks and rejoins double-stranded DNA in the inter-conversion of different topological forms of DNA – has also been associated with MDR by controlling the expression of proto-oncogenes. Several antitumor agents have been postulated to inhibit topoisomerase II activity. There are several reports in the literature that implicate reduced topoisomerase II activity in the drug-resistance phenotype. The reduction in catalytic and cleavage activity of topoisomerase II in resistant cells may represent either a quantitative or qualitative change in the enzyme [61,62].

Cho et al. [63] showed statistically significant differences in MRP and GST- π levels between OSCC and normal oral mucosa tissue. Other authors confirm the results, suggesting that MRP expression is activated during OSCC tumorigenesis and perhaps plays an important role in de novo MDR in such tumors [24] (Fig. 3).

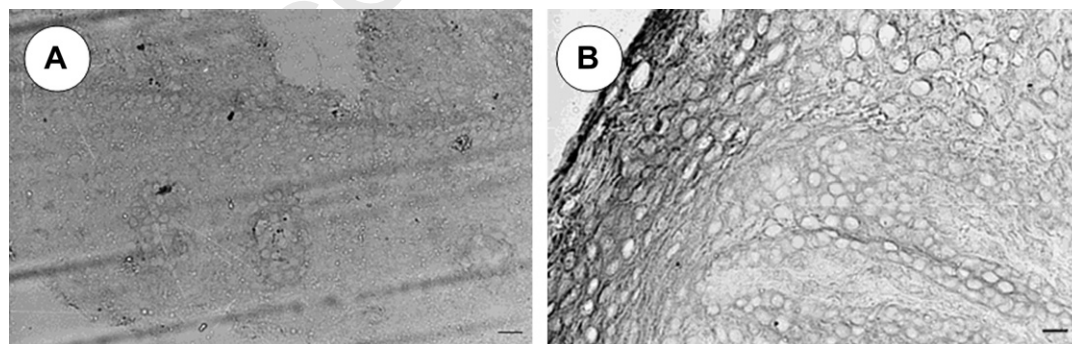


Fig. 2. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein using the C-219 MAb in frozen sections of oral tissues. (a) Negative Pgp staining in normal mucosa. (b) Dysplasia showing plasma-membrane staining for Pgp. Scale bars, 100 μ m [45].

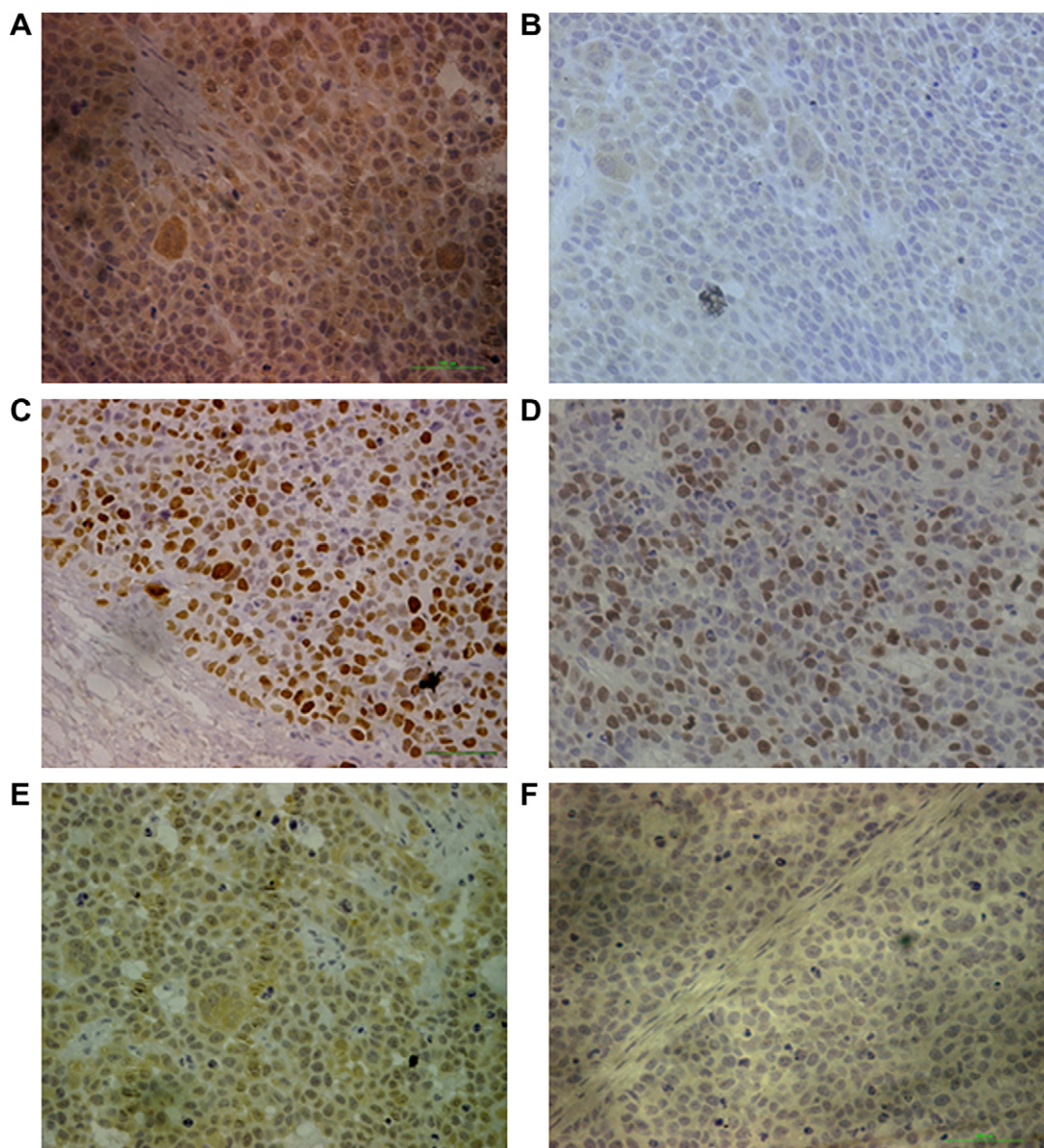


Fig. 3. Expression levels of MDR-related proteins were elevated in the tumors of the Tca8113/CBP group. (A) MRP1, (C) Topo II and (E) GST-p staining in the Tca8113/CBP group. (B) MRP1, (D) Topo II and (F) GST-p staining in the Tca8113 group. Image magnification: $\times 400$ [24].

The mechanisms underlying MDR response are less clear in OSCC than in other types of tumors [64]. In a recent study, Okamoto et al. [65] correlated chemosensitivity in OSCC cell lines with the caveolin family and in particular with caveolin-1. Caveolins are integral 21 kDa and 24 kDa proteins and are the main component of caveolar membranes [65]. Caveolin-1, one of the three caveolin genes, has been found to be significantly underexpressed in resistant OSCC cell lines compared to OSCC cell lines sensitive to cisplatin [66], and in the same study, immunohistochemical staining showed that caveolin-1 was associated with positive treatment response in 80% of cases.

Another molecule that has been linked to MDR is CD147, an extracellular matrix metalloproteinase inducer

that is overexpressed on the surface of diverse tumor cells [67]. The pretreatment of chemoresistant cell lines with immunosuppressants such as cyclophilin A and cyclosporin A has been seen to increase sensitivity to VCR and 5-fluoracil [68,69]. Finally, silencing of CD147 by RNA interference was recently found to induce apoptosis in MDR cancer cells through the depletion of the X-linked inhibitor of apoptosis [68].

MDR holds challenges for both researchers and the pharmaceutical industry. Accordingly, efforts are being made on all sides to find anticancer compounds characterized not only by high tolerability and oral bioavailability but also by the ability to overcome the problem of drug resistance. Tropane alkaloids, for example, are currently

being used to revert MDR [70]. Mi et al. [71] recently described a new tropane alkaloid aromatic ester called Pervilleine F that is capable of restoring vinblastine sensitivity in Pgp-mediated MDR. It was found that the in vivo tumor growth of squamous cell lines did not vary when either vinblastine or Pervilleine F were administered alone, but when administered together, a growth arrest rate of 64.1% was observed. These authors consider Pervilleine F to be a Pgp inhibitor. Other drugs that are producing good results in this area are taxinine analogues [72]. IDN5109 is a new-generation taxane with a marked antitumor effect mediated by the upregulation of Bax and caspase-3 and the downregulation of Bcl-2 and Bcl-Bcl-XL [73]. Bcl-XL, a member of the Bcl-2 superfamily, has been associated with resistance to chemotherapy agents including carboplatin [74]. The addition of antisense oligonucleotides has been found to inhibit cell growth and improve response, above all in MDR-OSCC [75].

Other substances used to revert MDR in human tumor cells include antisense oligodeoxynucleotide-doxorubicin conjugates [76]; triazinoaminopiperidine derivatives such as S9788, which is more potent than verapamil [77]; 3,5-dibenzoyl-1,4-dihydropyridines [78]; epidermal growth factor inhibitors such as AG1478 (in cisplatin-resistant tumors) [79,80]; telomerase activity inhibitors (in cisplatin-resistant tumors where telomerase levels are elevated) [81]; and tea polyphenols, which have been proposed as potential MDR modulators [82]. Other more innovative techniques include the use of low-dose fractionated radiotherapy to block the induction of Pgp expression through the transcriptional silencing of nuclear factor- κ B and the activation of NF- κ B [83].

El COCE es altamente resistente a una amplia gama de fármacos estructuralmente diferentes y con mecanismos de acción citotóxicos distintos. La gran mayoría de los pacientes responden de manera parcial al tratamiento mientras que sólo un pequeño porcentaje presenta una remisión completa de la lesión que en la gran mayoría de los casos, recidiva a los pocos meses de haber finalizado la quimioterapia. En un nuevo ciclo de quimioterapia estos pacientes suelen exhibir una menor respuesta a las drogas administradas [7]. Esto sugiere que el COCE puede ser intrínsecamente quimiorresistente, y en donde pueden jugar un papel importante otras moléculas, entre ellas las V-ATPasas [8].

La supervivencia de los pacientes con OSCC no ha mejorado significativamente en las últimas tres décadas. Una de las principales razones del fracaso del tratamiento es la recidiva locoregional, el desarrollo de tumores secundarios y el incremento de los factores relacionados con la MDR que ocurren como resultado de una exposición crónica de los pacientes con un OSCC avanzado a varios fármacos [73]. En cuanto a la 5-year overall survival (OS), por lo general se sitúa cerca de los 5 años cuando se consideran todos los estadios de diagnóstico. La supervivencia del estadio I se acerca al 90%, por lo que se requiere un énfasis en la detección temprana para mejorar el pronóstico de vida del paciente. En cuanto a la supervivencia en los estadios III y IV, permanece en torno al 50% o menos [24]. Incluso con el multimodal treatment, the 3-year, disease-free

cure rates para el cáncer oral, permanece en el rango del 30–40% [62,83].

Cisplatin and other platinum compounds are the most clinically effective chemotherapeutic agents used for the treatment of OSCC. Acquired resistance to cisplatin is an issue in cancer chemotherapy. Although the administration of cisplatin before and after surgery improves the prognosis of patients with OSCC, the 5-year survival rates are still not satisfactory [25,26].

En el caso de la leucemia mieloide aguda, el análisis multivariante revela una pobre respuesta a la quimioterapia asociada al incremento de la edad y a la expresión de moléculas relacionadas con la quimiorresistencia (LRP y Pgp). La DFS y la OS se vieron drásticamente reducidas en los casos de elevada expresión de de estas moléculas. Estos hallazgos ponen de manifiesto la relevancia clínica de las proteínas relacionadas con la MDR y la necesidad de modular su función para revertir el fenotipo resistente en la leucemia mieloide aguda [49].

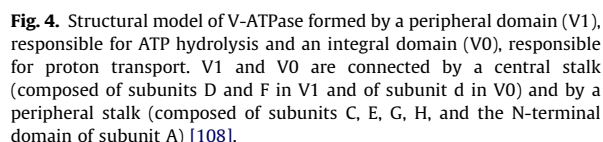
En el caso del oscc, se ha visto que la adición de taxane, docetaxel o paclitaxel al tratamiento estándar con cisplatino y 5-fluoracilo, ha demostrado una mejora en la OS en el cáncer de cabeza y cuello [48]. Sin embargo, no existe ningún estudio que relacione la expresión de multidrug resistance-associated proteins, glutathione S-transferase- π , DNA topoisomerase II o V-ATPasas, ni con la DFS ni la OS en el OSCC.

4. The role of V-ATPases in MDR

It has been demonstrated that hypoxia and acidity contribute to the transition from benign to malignant growth via the selection of tumor cells capable of surviving in an acidic, oxygen-deprived environment. Acidity, for example, has been associated with chemotherapy resistance [84], proliferation [85], and metastatic behavior [86]. Indeed, alteration of the pH gradient between the extracellular environment and the cell cytoplasm has been suggested as a possible mechanism of resistance to cytotoxic drugs [87] (Fig. 4).

The alteration of cytosolic pH also plays an important role in drug resistance in chemotherapy. Extracellular pH in solid tumors is significantly more acidic than in normal tissue. This increased acidity interferes with the absorption of basic chemotherapy drugs, reducing their effect on tumors [2,3]. Martínez-Zaguilán et al. [88] described the regulating mechanisms of cytosolic pH in chemosensitive and chemoresistant lung cancer cells, and showed that neither Na^+/H^+ nor anion exchanger activity was differentially increased or decreased in either of the cell lines. In the absence of Na^+ and HCO_3^- , the authors found that unlike chemoresistant cells, chemosensitive cells did not recover from acid load [88]. Becelli et al. [89] found that reversed pH gradient was directly related to drug resistance.

Anaerobic metabolism is an important determinant of tumor acidity that allows the selection of cells capable of surviving in a hypoxic-anaerobic environment via the synthesis of lactate. It is not, however, the most powerful mechanism involved in the development of an acidic environment in solid tumors. A complex system of protein-



protein, protein-lipid, and lipid-lipid interactions appear to regulate pH homeostasis in mammal cells, and it seems as if malignant tumor cells are capable of exploiting some of these mechanisms to protect themselves from the acidic environment, while maintaining levels of acidity that are poorly tolerated by normal or more differentiated cells [90].

Martínez-Zaguilán et al. [88] failed to localize V-ATPases in the plasma membrane using immunohistochemical techniques and suggested that plasma membrane V-ATPase activity in tumor cells might be “the consequence of rapid endomembrane turnover”. The effectiveness of the drug transport mechanism appears to be comparable to that of drug efflux pumps such as Pgp, although vesicle acid exchange (above all in vesicles that have an active H⁺/cation exchange system) may be an important factor in drug resistance, and particularly in cells that do not overexpress Pgp-type efflux pumps in the plasma membrane [93]. Raghunand and Gillies [94], however, stated that while the influence of inhibitors of vesicle trafficking has been demonstrated *in vitro*, the mechanisms regulating vesicle-mediated resistance need to be explored *in vivo* to evaluate their efficacy and toxicity [94].

these subunits. They also found significantly higher levels of cellular pH in cisplatin-resistant tumor cells than in cells sensitive to vincristine and etoposide. In a later study, however, Zhang et al. [96] identified 38 overexpressed genes and 25 underexpressed genes in cisplatin-resistant OSCC. The different methods used in the selection of candidate genes might explain why V-ATPase subunits were not downregulated, a theory which is consistent with the view that V-ATPases are largely responsible for regulating pH and H^+ transport in tumor cells [95].

The above findings suggest that the induced expression of V-ATPases in MDR is an anti-apoptotic defense and that the combined use of PPIs and low chemotherapy doses might be a possible treatment target [97]. The loss of genes *rav1* and *lac1*, which are V-ATPase function regulators, in *Schizosaccharomyces pombe* cells has been associated with an increase in both ceramide production and multidrug sensitivity [100].

PPIs are the treatment of choice for peptic diseases such as gastroesophageal reflux [101]. While these pumps block the secretion of gastric acid, they also directly inhibit V-ATPase activity. Examples of PPIs include omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole [102], all of which accumulate in acidic compartments [87]. PPI treatment has been associated with V-ATPase activity inhibition and an increase in both extracellular pH and pH in lysosomal organelles. In vivo experiments using mice/human xenografts have shown that pretreatment with PPIs can sensitize solid human tumors to chemotherapy drugs [87].

Treatment with PPIs has also been found to sensitize tumor cells to cisplatin, 5-fluoracil, and vinblastine through changes in cellular pH gradients, with retention of the drugs in the cytoplasm, and in the nucleus in the case of doxorubicin [87,91,91,103].

It is also known that low pH levels are suitable for the complete activation of PPIs [104], suggesting that tumor alkalization may be an extremely interesting target for future anticancer treatments [87,90,91]. Specific V-ATPase inhibitors such as concanamycin and bafilomycins are other candidates for investigation, not only to treat cancer but also to reduce MDR in tumors [105,106].

5. Conclusions and perspectives

Pgp, a product of the *MDR1* gene, appears to be responsible for MDR in most tumors. Nonetheless, while other molecules such as MRP, GST- π , and topoisomerase II have been implicated in the development of drug resistance, none of them can fully explain this phenomenon in the case of OSCC. There is sufficient evidence to suggest that

V-ATPase, which is believed to be largely responsible for regulating the acidity of the tumor microenvironment, may also be inherently responsible for MDR in solid tumors such as OSCC via the chemical control of the absorption of chemotherapy drugs. We believe that it is extremely important to continue investigating the use of specific V-ATPase inhibitors, not just as adjuvants in antitumor treatment but also a possible means of controlling resistance to antitumor drugs.

Conflicts of interest

None declared.

References

- [1] D. Nielsen, T. Skovsgaard, P-glycoprotein as multidrug transporter: a critical review of current multidrug resistant cell lines, *Biochim. Biophys. Acta* 1139 (1992) 169–183.
- [2] J.R. Griffiths, Are cancer cells acidic?, *Br J. Cancer* 64 (1991) 425–427.
- [3] W. Negendank, Studies of human tumors by MRS: a review, *NMR Biomed.* 5 (1992) 303–324.
- [4] K. Newell, A. Franchi, J. Pouyssegur, I. Tannock, Studies with glycolysis-deficient cells suggest that production of lactic acid is not the only cause of tumor acidity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 1127–1131.
- [5] M. Yamagata, K. Hasuda, T. Stamato, I.F. Tannock, The contribution of lactic acid to acidification of tumours: studies of variant cells lacking lactate dehydrogenase, *Br. J. Cancer* 77 (1998) 1726–1731.
- [6] Y. Tanigawara, Role of P-glycoprotein in drug disposition, *Ther. Drug Monit.* 22 (2000) 137–140.
- [7] H.L. McLeod, W.E. Evans, Oral cancer chemotherapy: the promise and the pitfalls, *Clin. Cancer Res.* 5 (1999) 2669–2671.
- [8] M. Perez-Sayans, A. Garcia-Garcia, M.D. Reboiras-Lopez, P. Gandara-Vila, Role of V-ATPases in solid tumors: importance of the subunit C, *Int. J. Oncol.* 34 (2009) 1513–1520.
- [9] R.C. Young, Mechanisms to improve chemotherapy effectiveness, *Cancer* 65 (1990) 815–822.
- [10] K.L. Deuchars, V. Ling, P-glycoprotein and multidrug resistance in cancer chemotherapy, *Semin. Oncol.* 16 (1989) 156–165.
- [11] R.L. Juliano, V. Ling, A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants, *Biochim. Biophys. Acta* 455 (1976) 152–162.
- [12] M.M. Gottesman, I. Pastan, Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter, *Annu. Rev. Biochem.* 62 (1993) 385–427.
- [13] M.M. Gottesman, I. Pastan, The multidrug transporter, a double-edged sword, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 12163–12166.
- [14] Y. Raviv, H.B. Pollard, E.P. Bruggemann, I. Pastan, M.M. Gottesman, Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 3975–3980.
- [15] K. Yoshizawa, S. Nozaki, H. Kitahara, T. Ohara, K. Kato, S. Kawashiri, et al., Copper efflux transporter (ATP7B) contributes to the acquisition of cisplatin-resistance in human oral squamous cell lines, *Oncol. Rep.* 18 (2007) 987–991.
- [16] E. Farber, Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals: G.H.A. Clowes memorial lecture, *Cancer Res.* 44 (1984) 5463–5474.
- [17] R.K. Burt, S. Garfield, K. Johnson, S.S. Thorgeirsson, Transformation of rat liver epithelial cells with v-H-ras or v-raf causes expression of MDR-1, glutathione-S-transferase-P and increased resistance to cytotoxic chemicals, *Carcinogenesis* 9 (1988) 2329–2332.
- [18] J.A. Silverman, S.S. Thorgeirsson, Regulation and function of the multidrug resistance genes in liver, *Prog. Liver Dis.* 13 (1995) 101–123.
- [19] J. Sun, Z.G. He, G. Cheng, S.J. Wang, X.H. Hao, M.J. Zou, Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction, *Med. Sci. Monit.* 10 (2004) RA5–RA14.
- [20] A. Tsuji, A. Sakata, I. Tamai, Tissue distribution of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein and its physiological function, *Nippon Rinsho* 55 (1997) 1059–1063.
- [21] M.J. Flens, G.J. Zaman, P. Van der Valk, M.A. Izquierdo, A.B. Schroeijers, et al., Tissue distribution of the multidrug resistance protein, *Am. J. Pathol.* 148 (1996) 1237–1247.
- [22] Z.P. Pavelic, J. Reising, L. Pavelic, D.J. Kelley, P.J. Stambrook, J.L. Gluckman, Detection of P-glycoprotein with four monoclonal antibodies in normal and tumor tissues, *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 119 (1993) 753–757.
- [23] P. van der Valk, C.K. van Kalken, H. Ketelaars, H.J. Broxterman, G. Scheffer, C.M. Kuiper, et al., Distribution of multi-drug resistance-associated P-glycoprotein in normal and neoplastic human tissues. Analysis with 3 monoclonal antibodies recognizing different epitopes of the P-glycoprotein molecule, *Ann. Oncol.* 1 (1990) 56–64.
- [24] G. Feng, D.Z. Wang, H.Q. Chen, J. Hu, J. He, A new method to induce multi-drug resistance to carboplatin in a mouse model of human tongue squamous cell carcinoma, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 37 (2008) 1141–1147.
- [25] S. McClean, L.K. Hosking, B.T. Hill, Dominant expression of multiple drug resistance after in vitro X-irradiation exposure in intraspecific Chinese hamster ovary hybrid cells, *J. Natl. Cancer Inst.* 85 (1993) 48–53.
- [26] B.T. Hill, K. Deuchars, L.K. Hosking, V. Ling, R.D. Whelan, Overexpression of P-glycoprotein in mammalian tumor cell lines after fractionated X irradiation in vitro, *J. Natl. Cancer Inst.* 82 (1990) 607–612.
- [27] T. Leitha, C. Glaser, S. Lang, Is early sestamibi imaging in head and neck cancer affected by MDR status, p53 expression, or cell proliferation?, *Nucl. Med. Biol.* 25 (1998) 539–541.
- [28] I.O. Ng, K.Y. Lam, M. Ng, D.L. Kwong, J.S. Sham, Expression of P-glycoprotein, a multidrug-resistance gene product, is induced by radiotherapy in patients with oral squamous cell carcinoma, *Cancer* 83 (1998) 851–857.
- [29] R.S. Weinstein, S.M. Jakate, J.M. Dominguez, M.D. Lebovitz, G.K. Koukoulis, J.R. Kuszak, et al., Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis, *Cancer Res.* 51 (1991) 2720–2726.
- [30] K.V. Chin, K. Ueda, I. Pastan, M.M. Gottesman, Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53, *Science* 255 (1992) 459–462.
- [31] S.B. Bordow, M. Haber, J. Madafoglio, B. Cheung, G.M. Marshall, M.D. Norris, Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene correlates with amplification and overexpression of the N-myc oncogene in childhood neuroblastoma, *Cancer Res.* 54 (1994) 5036–5040.
- [32] M.D. Norris, S.B. Bordow, G.M. Marshall, P.S. Haber, S.L. Cohn, M. Haber, Expression of the gene for multidrug-resistance-associated protein and outcome in patients with neuroblastoma, *N. Engl. J. Med.* 334 (1996) 231–238.
- [33] M. Volm, M. Kastel, J. Mattern, T. Efferth, Expression of resistance factors (P-glycoprotein, glutathione S-transferase-pi, and topoisomerase II) and their interrelationship to proto-oncogene products in renal cell carcinomas, *Cancer* 71 (1993) 3981–3987.
- [34] T. Asakura, A. Imai, N. Ohkubo-Uraoka, M. Kuroda, Y. Iidaka, K. Uchida, et al., Relationship between expression of drug-resistance factors and drug sensitivity in normal human renal proximal tubular epithelial cells in comparison with renal cell carcinoma, *Oncol. Rep.* 14 (2005) 601–607.
- [35] J.C. Leighton Jr, L.J. Goldstein, P-glycoprotein in adult solid tumors. Expression and prognostic significance, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 9 (1995) 251–273.
- [36] J.P. Marie, P-glycoprotein in adult hematologic malignancies, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 9 (1995) 239–249.
- [37] P. Verrelle, F. Meissonnier, Y. Fonck, V. Feillel, C. Dionet, F. Kwiatkowski, et al., Clinical relevance of immunohistochemical detection of multidrug resistance P-glycoprotein in breast carcinoma, *J. Natl. Cancer Inst.* 83 (1991) 111–116.
- [38] D. Brown, T.G. Paunescu, S. Breton, V. Marshansky, Regulation of the V-ATPase in kidney epithelial cells: dual role in acid-base homeostasis and vesicle trafficking, *J. Exp. Biol.* 212 (2009) 1762–1772.
- [39] L.J. Goldstein, H. Galski, A. Fojo, M. Willingham, S.L. Lai, A. Gazdar, et al., Expression of a multidrug resistance gene in human cancers, *J. Natl. Cancer Inst.* 81 (1989) 116–124.
- [40] E.R. Fearon, B. Vogelstein, A genetic model for colorectal tumorigenesis, *Cell* 61 (1990) 759–767.
- [41] V. Ling, Multidrug resistance. Molecular mechanisms and clinical relevance, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 40 (1997) 3–8.

- [42] V. Jain, S.N. Das, K. Luthra, N.K. Shukla, R. Ralhan, Differential expression of multidrug resistance gene product, P-glycoprotein, in normal, dysplastic and malignant oral mucosa in India, *Int. J. Cancer* 74 (1997) 128–133.
- [43] P. Chomczynski, N. Sacchi, The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 581–585.
- [44] Z.J. Xie, X.F. Yang, Z.Y. Gu, Q.L. Wu, P-glycoprotein expression in squamous cell carcinoma of the oral and maxillofacial region, *Chin. J. Dent. Res.* 3 (2000) 23–26.
- [45] R. Ralhan, M. Narayan, P. Salotra, N.K. Shukla, S.S. Chauhan, Evaluation of P-glycoprotein expression in human oral oncogenesis: correlation with clinicopathological features, *Int. J. Cancer* 72 (1997) 728–734.
- [46] L. Lo Muzio, S. Staibano, G. Pannone, M.D. Mignogna, R. Serpico, C. Rubini, et al., The human multidrug resistance gene (MDR-1): immunocytochemical detection of its expression in oral SCC, *Anticancer Res.* 20 (2000) 2891–2897.
- [47] H. Okamura, K. Yoshida, E. Sasaki, H. Morimoto, T. Haneji, Transcription factor NF- κ B regulates *mdr1* expression through binding to inverted CCAAT sequence in drug-resistant human squamous carcinoma cells, *Int. J. Oncol.* 25 (2004) 1031–1037.
- [48] H. Naramoto, T. Uematsu, T. Uchihashi, R. Doto, T. Matsuura, Y. Usui, et al., Multidrug resistance-associated protein 7 expression is involved in cross-resistance to docetaxel in salivary gland adenocarcinoma cell lines, *Int. J. Oncol.* 30 (2007) 393–401.
- [49] T. Uematsu, T. Hasegawa, B.Y. Hiraoka, F. Komatsu, T. Matsuura, A.S. Yamada, et al., Multidrug resistance gene 1 expression in salivary gland adenocarcinomas and oral squamous-cell carcinomas, *Int. J. Cancer* 92 (2001) 187–194.
- [50] W.J. Kim, Y. Kakehi, H. Kinoshita, S. Arai, M. Fukumoto, O. Yoshida, Expression patterns of multidrug-resistance (MDR1), multidrug resistance-associated protein (MRP), glutathione-S-transferase-pi (GST-pi) and DNA topoisomerase II (Topo II) genes in renal cell carcinomas and normal kidney, *J. Urol.* 156 (1996) 506–511.
- [51] W.J. Kim, Y. Kakehi, M. Hirai, S. Arai, H. Hiai, M. Fukumoto, et al., Multidrug resistance-associated protein-mediated multidrug resistance modulated by cyclosporin A in a human bladder cancer cell line, *Jpn. J. Cancer Res.* 86 (1995) 969–977.
- [52] K. Endo, Y. Maehara, T. Kusumoto, Y. Ichiyoshi, M. Kuwano, K. Sugimachi, Expression of multidrug-resistance-associated protein (MRP) and chemosensitivity in human gastric cancer, *Int. J. Cancer* 68 (1996) 372–377.
- [53] K. Endo, Y. Maehara, Y. Ichiyoshi, T. Kusumoto, Y. Sakaguchi, S. Ohno, et al., Multidrug resistance-associated protein expression in clinical gastric carcinoma, *Cancer* 77 (1996) 1681–1687.
- [54] P. Ruzza, A. Rosato, C.R. Rossi, M. Floreani, L. Quintieri, Glutathione transferases as targets for cancer therapy, *Anticancer Agents Med. Chem.* 9 (2009) 763–777.
- [55] J.B. Engel, A.V. Schally, G. Halmos, B. Baker, A. Nagy, G. Keller, Targeted therapy with a cytotoxic somatostatin analog, AN-238, inhibits growth of human experimental endometrial carcinomas expressing multidrug resistance protein MDR-1, *Cancer* 104 (2005) 1312–1321.
- [56] M. Koshiyama, H. Fujii, M. Kinezaki, Y. Morita, H. Nanno, M. Yoshida, Immunohistochemical expression of topoisomerase II α (Topo II α) and multidrug resistance-associated protein (MRP), plus chemosensitivity testing, as chemotherapeutic indices of ovarian and endometrial carcinomas, *Anticancer Res.* 21 (2001) 2925–2932.
- [57] Y.K. Chen, L.M. Lin, Evaluation of glutathione S-transferase activity in human buccal epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 26 (1997) 205–209.
- [58] L. Zhang, Y. Xiao, R. Priddy, Increase in placental glutathione S-transferase in human oral epithelial dysplastic lesions and squamous cell carcinomas, *J. Oral Pathol. Med.* 23 (1994) 75–79.
- [59] M.B. Oude Ophuis, T.P. Mulder, W.H. Peters, J.J. Manni, Plasma glutathione S-transferase P1-1 levels in patients with head and neck squamous cell carcinoma, *Cancer* 82 (1998) m2434–2438.
- [60] X. Wang, Z.P. Pavelic, Y. Li, L. Gleich, P.S. Gartside, L. Pavelic, et al., Overexpression and amplification of glutathione S-transferase pi gene in head and neck squamous cell carcinomas, *Clin. Cancer Res.* 3 (1997) 111–114.
- [61] A.M. Deffie, J.K. Batra, G.J. Goldenberg, Direct correlation between DNA topoisomerase II activity and cytotoxicity in adriamycin-sensitive and -resistant P388 leukemia cell lines, *Cancer Res.* 49 (1989) 58–62.
- [62] H. Shi, D. Lu, Y. Shu, W. Shi, S. Lu, K. Wang, Expression of multidrug resistance-related proteins p-glycoprotein, glutathione-S-transferases, topoisomerase-II and lung resistance protein in primary gastric cardiac adenocarcinoma, *Hepatogastroenterology* 55 (2008) 1530–1536.
- [63] Y.S. Cho, M.J. Kim, Expression of multidrug resistance-related genes in oral squamous cell carcinomas, *Oral Oncol.* 37 (2001) 652–659.
- [64] T. Yajima, H. Ochiai, T. Uchiyama, N. Takano, T. Shibahara, T. Azuma, Resistance to cytotoxic chemotherapy-induced apoptosis in side population cells of human oral squamous cell carcinoma cell line Ho-1-N-1, *Int. J. Oncol.* 35 (2009) 273–280.
- [65] T. Okamoto, A. Schlegel, P.E. Scherer, M.P. Lisanti, Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing “preassembled signaling complexes” at the plasma membrane, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 5419–5422.
- [66] K. Nakatani, T. Wada, M. Nakamura, K. Uzawa, H. Tanzawa, S. Fujita, Expression of caveolin-1 and its correlation with cisplatin sensitivity in oral squamous cell carcinoma, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 131 (2005) 445–452.
- [67] T. Kanekura, X. Chen, T. Kanzaki, Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts, *Int. J. Cancer* 99 (2002) 520–528.
- [68] Y.H. Kuang, X. Chen, J. Su, L.S. Wu, L.Q. Liao, D. Li, et al., RNA interference targeting the CD147 induces apoptosis of multi-drug resistant cancer cells related to XIAP depletion, *Cancer Lett.* 276 (2009) 189–195.
- [69] Y.H. Kuang, X. Chen, J. Su, L.S. Wu, J. Li, J. Chang, et al., Proteome analysis of multidrug resistance of human oral squamous carcinoma cells using CD147 silencing, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 4784–4791.
- [70] D. Chavez, B. Cui, H.B. Chai, R. Garcia, M. Mejia, N.R. Farnsworth, et al., Reversal of multidrug resistance by tropane alkaloids from the stems of *Erythroxylum rotundifolium*, *J. Nat. Prod.* 65 (2002) 606–610.
- [71] Q. Mi, B. Cui, D. Lantvit, E. Reyes-Lim, H. Chai, J.M. Pezzuto, et al., Pervilleine F, a new tropane alkaloid aromatic ester that reverses multidrug resistance, *Anticancer Res.* 23 (2003) 3607–3615.
- [72] X. Zhao, J. Gu, D. Yin, X. Chen, Synthesis and biological evaluation of taxinine analogues as orally active multidrug resistance reversal agents in cancer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 4767–4770.
- [73] D. Sano, H. Matsuda, Y. Ishiguro, G. Nishimura, M. Kawakami, M. Tsukuda, Antitumor effects of IDN5109 on head and neck squamous cell carcinoma, *Oncol. Rep.* 15 (2006) 329–334.
- [74] T. Noutomi, H. Chiba, M. Itoh, H. Toyota, J. Mizuguchi, Bcl-x(L) confers multi-drug resistance in several squamous cell carcinoma cell lines, *Oral Oncol.* 38 (2002) 41–48.
- [75] M. Itoh, T. Noutomi, H. Chiba, J. Mizuguchi, Bcl-xL antisense treatment sensitizes Bcl-xL-overexpressing squamous cell carcinoma cells to carboplatin, *Oral Oncol.* 38 (2002) 752–756.
- [76] Y. Ren, D. Wei, J. Liu, W. Su, An antisense oligodeoxynucleotide-doxorubicin conjugate: preparation and its reversal multidrug resistance of human carcinoma cell line in vitro, *Nucleosid. Nucleotid. Nucl. Acids* 23 (2004) 1595–1607.
- [77] V. Perez, A. Pierre, S. Leone, M. Anstett, G. Atassi, Effect of duration of exposure to S9788, cyclosporin A or verapamil on sensitivity of multidrug resistant cells to vincristine or doxorubicin, *Anticancer Res.* 13 (1993) 985–990.
- [78] M. Kawase, A. Shah, H. Gaveriya, N. Motohashi, H. Sakagami, A. Varga, et al., 3,5-dibenzoyl-1,4-dihydropyridines: synthesis and MDR reversal in tumor cells, *Bioorg. Med. Chem.* 10 (2002) 1051–1055.
- [79] Y. Hiraiishi, T. Wada, K. Nakatani, I. Tojiyo, T. Matsumoto, N. Kiga, et al., EGFR inhibitor enhances cisplatin sensitivity of oral squamous cell carcinoma cell lines, *Pathol. Oncol. Res.* 14 (2008) 39–43.
- [80] P. Baumeister, S. Schwenk-Zieger, M. Reiter, C. Welz, U. Harreus, Transforming growth factor- α reduces carcinogen-induced DNA damage in mini-organ cultures from head-and-neck cancer patients, *Mutat. Res.* 677 (2009) 42–45.
- [81] H. Mese, Y. Ueyama, A. Suzuki, S. Nakayama, A. Sasaki, H. Hamakawa, et al., Inhibition of telomerase activity as a measure of tumor cell killing by cisplatin in squamous cell carcinoma cell line, *Chemotherapy* 47 (2001) 136–142.
- [82] D. Wei, Y. Mei, J. Liu, Quantification of doxorubicin and validation of reversal effect of tea polyphenols on multidrug resistance in human carcinoma cells, *Biotechnol. Lett.* 25 (2003) 291–294.
- [83] M.M. Shareef, B. Brown, S. Shajahan, S. Sathishkumar, S.M. Arnold, M. Mohiuddin, et al., Lack of P-glycoprotein expression by low-dose fractionated radiation results from loss of nuclear factor-kappaB

- and NF- κ B activation in oral carcinoma cells, *Mol. Cancer Res.* 6 (2008) 89–98.
- [84] N. Raghunand, B. Mahoney, R. van Sluis, B. Baggett, R.J. Gillies, Acute metabolic alkalosis enhances response of C3H mouse mammary tumors to the weak base mitoxantrone, *Neoplasia* 3 (2001) 227–235.
- [85] T. Morita, T. Nagaki, I. Fukuda, K. Okumura, Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutat. Res.* 268 (1992) 297–305.
- [86] R. Martínez-Zaguilán, E.A. Seftor, R.E. Seftor, Y.W. Chu, R.J. Gillies, M.J. Hendrix, Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells, *Clin. Exp. Metastasis* 14 (1996) 176–186.
- [87] A. De Milito, S. Fais, Proton pump inhibitors may reduce tumour resistance, *Expert Opin. Pharmacother.* 6 (2005) 1049–1054.
- [88] R. Martínez-Zaguilán, N. Raghunand, R.M. Lynch, W. Bellamy, G.M. Martínez, B. Rojas, et al., pH and drug resistance. I. Functional expression of plasmalemmal V-type H⁺-ATPase in drug-resistant human breast carcinoma cell lines, *Biochem. Pharmacol.* 57 (1999) 1037–1046.
- [89] R. Becelli, G. Renzi, R. Morello, F. Altieri, Intracellular and extracellular tumor pH measurement in a series of patients with oral cancer, *J. Craniofac. Surg.* 18 (2007) 1051–1054.
- [90] A. De Milito, S. Fais, Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors, *Future Oncol.* 1 (2005) 779–786.
- [91] F. Luciani, M. Spada, A. De Milito, A. Molinari, L. Rivoltini, A. Montinaro, et al., Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs, *J. Natl. Cancer Inst.* 96 (2004) 1702–1713.
- [92] S.R. Sennoun, D. Luo, R. Martínez-Zaguilán, Plasmalemmal vacuolar-type H⁺-ATPase in cancer biology, *Cell Biochem. Biophys.* 40 (2004) 185–206.
- [93] N. Raghunand, R. Martínez-Zaguilán, S.H. Wright, R.J. Gillies, pH and drug resistance. II. Turnover of acidic vesicles and resistance to weakly basic chemotherapeutic drugs, *Biochem. Pharmacol.* 57 (1999) 1047–1058.
- [94] N. Raghunand, R.J. Gillies, pH and drug resistance in tumors, *Drug Resist. Updat.* 3 (2000) 39–47.
- [95] T. Murakami, I. Shibuya, T. Ise, Z.S. Chen, S. Akiyama, M. Nakagawa, et al., Elevated expression of vacuolar proton pump genes and cellular pH in cisplatin resistance, *Int. J. Cancer* 93 (2001) 869–874.
- [96] P. Zhang, Z. Zhang, X. Zhou, W. Qiu, F. Chen, W. Chen, Identification of genes associated with cisplatin resistance in human oral squamous cell carcinoma cell line, *BMC Cancer* 6 (2006) 224.
- [97] T. Torigoe, H. Izumi, H. Ishiguchi, H. Uramoto, T. Murakami, T. Ise, et al., Enhanced expression of the human vacuolar H⁺-ATPase c subunit gene (ATP6L) in response to anticancer agents, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 36534–36543.
- [98] J. Kluza, A. Lansiaux, N. Wattez, C. Mahieu, N. Osherooff, C. Bailly, Apoptotic response of HL-60 human leukemia cells to the antitumor drug TAS-103, *Cancer Res.* 60 (2000) 4077–4084.
- [99] H. You, J. Jin, H. Shu, B. Yu, A. De Milito, F. Lozupone, et al., Small interfering RNA targeting the subunit ATP6L of proton pump V-ATPase overcomes chemoresistance of breast cancer cells, *Cancer Lett.* 280 (2009) 110–119.
- [100] K. Dawson, W.M. Toone, N. Jones, C.R. Wilkinson, Loss of regulators of vacuolar ATPase function and ceramide synthesis results in multidrug sensitivity in *Schizosaccharomyces pombe*, *Eukaryot. Cell.* 7 (2008) 926–937.
- [101] H. Larsson, H. Mattson, G. Sundell, E. Carlsson, Animal pharmacodynamics of omeprazole. A survey of its pharmacological properties in vivo, *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 108 (1985) 23–35.
- [102] J. Horn, The proton-pump inhibitors: similarities and differences, *Clin. Ther.* 22 (2000) 266–280.
- [103] M. Cianfriglia, C. Cenciarelli, M. Tombesi, S. Barca, M. Mariani, S. Morrone, et al., Murine monoclonal antibody recognizing a 90-kDa cell-surface determinant selectively lost by multi-drug-resistant variants of CEM cells, *Int. J. Cancer* 45 (1990) 95–103.
- [104] A. De Milito, E. Iessi, M. Logozzi, F. Lozupone, M. Spada, M.L. Marino, et al., Proton pump inhibitors induce apoptosis of human B-cell tumors through a caspase-independent mechanism involving reactive oxygen species, *Cancer Res.* 67 (2007) 5408–5417.
- [105] M. Pérez-Sayáns, J.M. Somoza-Martin, F. Barros-Angueira, J.M. Rey, A. García-García, V-ATPase inhibitors and implication in cancer treatment, *Cancer Treat. Rev.* 35 (2009) 707–713.
- [106] Y. Sasazawa, Y. Futamura, E. Tashiro, M. Imoto, Vacuolar H⁺(+)-ATPase inhibitors overcome Bcl-xL-mediated chemoresistance through restoration of a caspase-independent apoptotic pathway, *Cancer Sci.* 100 (2009) 1460–1467.
- [107] N. Kartner, V. Ling, Multidrug resistance in cancer, *Sci. Am.* 260 (1989) 44–51.
- [108] J. Qi, Y. Wang, M. Forgac, The vacuolar (H⁺)-ATPase: subunit arrangement and in vivo regulation, *J. Bioenergy Biomembr.* 39 (2007) 423–426.

Measurement of ATP6V1C1 expression in brush cytology samples as a diagnostic and prognostic marker in oral squamous cell carcinoma

Mario Pérez-Sayáns,^{1,*} María Dolores Reboiras-López,¹ José Manuel Somoza-Martín,¹ Francisco Barros-Angueira,² Pilar Gayoso Diz,³ José Manuel Gándara Rey¹ and Abel García-García¹

¹Oral Medicine, Oral Surgery and Implantology Unit; Faculty of Medicine and Dentistry; Enterríos s/n; Santiago de Compostela, Spain; ²Unity of Molecular Medicine; Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica; Edificio de Consultas planta-2; Hospital Clínico Universitario; Santiago de Compostela, Spain; ³Department of Clinical Epidemiology; Edificio de Consultas planta 0, 15706; Complejo Hospitalario Universitario de Santiago; Santiago de Compostela, Spain

Key words: *ATP6V1C1*, oral squamous cell carcinoma, brush cytology, real-time quantitative polymerase chain reaction, ROC, diagnostic marker, metastasis

Abbreviations: *ATP6V1C1*, ATPase, H⁺ transporting, lysosomal 42 kDa, V1 subunit C, isoform 1; OSCC, oral squamous cell carcinoma; ROC, receiver operating characteristic

Background: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignancy of the oral cavity. Brush cytology has reemerged as a molecular tool for diagnosing this cancer. *ATP6V1C1*, one of the main genes regulating V-ATPase activity, has been implicated in metastasis and multiple drug resistance. The aim of this study was to measure *ATP6V1C1* expression levels in OSCC and to evaluate the value of this test in the diagnosis and prognosis of OSCC.

Results: The differences in *ATP6V1C1* expression between patients and controls were statistically significant (Mann-Whitney U test = 26, $p < 0.001$). Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis showed an area under the curve of 0.9476, with the following diagnostic indices: sensitivity, 81.25%, specificity, 93.75%; accuracy, 87.50%; positive predictive value, 92.86%; negative predictive value, 83.33%; positive likelihood ratio, 30; and negative likelihood ratio, 0.06.

Material and methods: Patients with OSCC and a control group of healthy individuals were studied. The clinical and demographic variables analyzed included age, sex, smoking, tumor location and tumor stage. Brush cytology samples were obtained using a cytology brush and analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction for *ATP6V1C1* expression.

Conclusions: It was confirmed that *ATP6V1C1* levels were significantly higher in patients with OSCC than in healthy controls, with expression increasing with higher tumor stage. ROC analysis showed that the measurement of *ATP6V1C1* expression levels is a highly sensitive and specific diagnostic method.

Introduction

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignancy of the oral cavity. Accounting for between 90% and 95% of all malignant lesions of the mouth, OSCC has become practically synonymous with oral cancer. Although diagnosis is based on pathology findings, the use of molecular analysis to search for early malignant changes in the oral mucosa or identify certain aspects of tumor behavior such as invasive capacity or metastasis is becoming increasingly common.^{1,2}

Although the TNM cancer staging system includes important prognostic factors, it cannot be used to accurately predict the biologic properties of tumors and is therefore of little value in guiding treatment strategies based on the biologic behavior of tumors.³ The ultimate goal when evaluating disease should be to

provide as accurate a prognosis as possible and, where possible, to establish a diagnosis in the early stages of disease.^{4,5}

While traditional cytological examination of oral lesions is labor intensive and requires extensive experience to identify and evaluate cells with suspect morphologic features, the analysis of molecular alterations with a view to detecting specific gene abnormalities is based on objective analysis.⁶ Brush cytology, for example, is a quick, simple and painless technique that can be used to detect early-stage cancer lesions.⁷⁻¹⁰

The main characteristics of OSCC, a solid tumor, are acidity and hypoxia, both of which have been implicated in tumor metastasis,¹¹ sensitivity to chemotherapy agents,^{12,13} and proliferation.¹⁴

Cytosolic pH appears to be strictly regulated by 4 mechanisms: sodium/proton exchangers (NHEs), bicarbonate transporters

*Correspondence to: Mario Pérez-Sayáns; Email: perezsayans@gmail.com

Submitted: 02/23/10; Revised: 03/23/10; Accepted: 03/25/10

Previously published online: www.landesbioscience.com/journals/cbt/article/11880

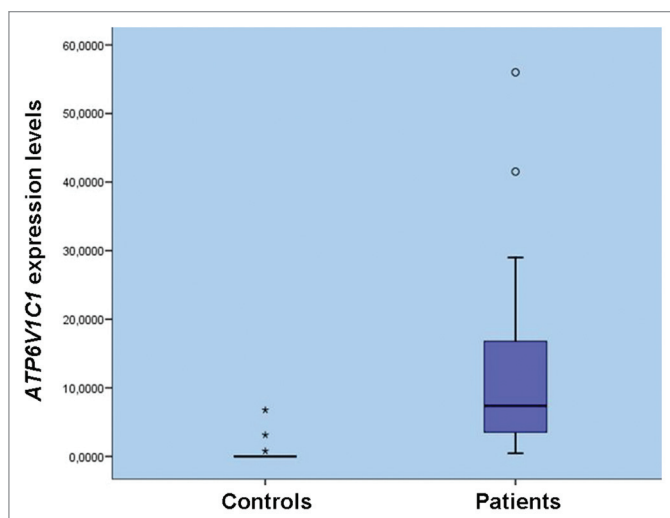


Figure 1. *ATP6V1C1* expression levels in patients and controls.

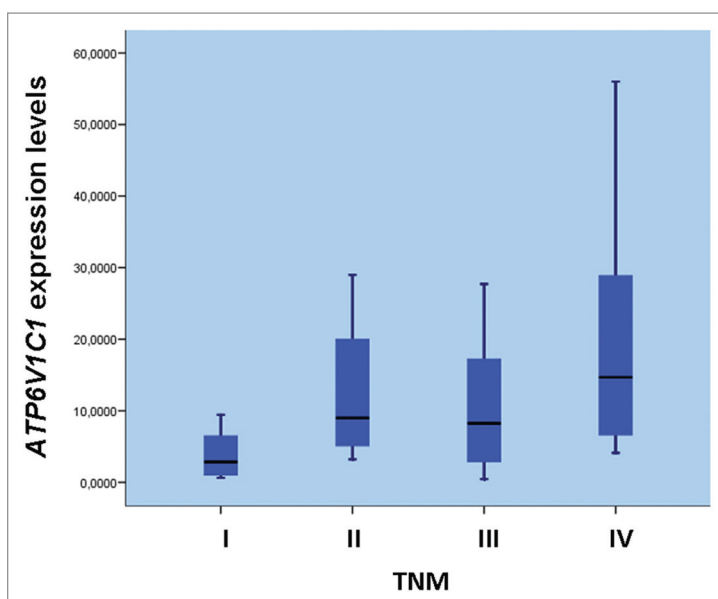


Figure 2. *ATP6V1C1* expression levels according to tumor stage.

(BCTs), monocarboxylate transporters (MCTs) and proton pumps (ATPases).^{15,16} Lactate production has commonly been considered to be the main mechanism underlying the acidification of the tumor microenvironment.¹⁷ Nonetheless, solid tumors such as OSCC are capable of creating an acidic environment, even in conditions of limited lactate production.^{18,19} To survive in this microenvironment, tumor cells need a cytosolic pH regulation system to help protect themselves from harmful H⁺ ions. This may explain why V-ATPases, which are normally located in acidic organelles, may also reside on the cell surface, where they regulate pH and increase the migratory capacity of metastatic cells.²⁰⁻²²

V-ATPase is composed of a cytosolic V1 domain and a transmembrane V0 domain. The former consists of 3 A subunits,

2 B subunits, 2 G subunits, and 1 C, D, E, F and H subunit. Two alternative transcript variants encoding different isoforms have been found in the gene that controls the expression of the C subunit: *ATP6V1C1* and *ATP6V1C2a,b*. While *ATP6V1C1* is expressed continuously in all tissues, *ATP6V1C2a,b* is found only in the lungs, kidneys and epididymis, where it has an actin-binding function.^{23,24}

The C subunit is a 40-kDa protein located in the V1 domain of V-ATPase.²⁵⁻²⁹ This subunit, which is essential for the proton secretion function of V-ATPases³⁰ is intimately involved in the reversible dissociation of the V1 and V0 domains³¹⁻³³ and is considered to be solely responsible for regulating the dissociative mechanism of the enzyme.^{34,35}

The present study is a follow-up of previous work by our group analyzing differential gene expression in OSCC and normal oral mucosa cells using DNA microarray analysis of biopsy samples.³⁶ Of 322 genes found to be overexpressed in tumor tissue compared to normal tissue, we observed, using real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR), that *ATP6V1C1* was overexpressed in 100% of OSCC samples.²⁴ In view of the important biological functions of this gene, we wished to measure *ATP6V1C1* levels in brush cytology OSCC samples and assess their value as tumor diagnostic and prognostic markers.

Results

Descriptive analysis. The mean (SD) age of the members of the OSCC group was 65.69 (12.01) years (range, 44 to 81 years); 75% were men and 25% women. Fifty percent of the group were smokers, 37.5% were non-smokers, and 12.5% were ex-smokers. Sixteen patients had primary intraoral tumors located on the tongue (31.3%), on the gums (25%), on the cheek (12.5%), on the floor of the mouth (18.8%), and in the retromolar trigone (12.5%). At the time of diagnosis, 25% of patients had stage I disease, 12.5% had stage II disease, 31.3% had stage III disease, and 31.3% had stage IV disease.

The mean (SD) age of the control group was 26.88 (3.37) years (range, 24–34 years); 25% were men and 75% were women. Less than half of the group (43.8%) were smokers, 56.25% were non-smokers, and there were no ex-smokers.

Analysis of associations between clinical and demographic characteristics. There were a majority of men (75%) in the OSCC group and a majority of women (75%) in the control group. This difference was statistically significant (Pearson chi-square = 16.00, $p < 0.001$). No statistically significant differences were found for any of the other clinical associations studied.

qRT-PCR analysis of *ATP6V1C1* expression. *Distribution of expression levels.* Mean (SD) *ATP6V1C1* expression was 12.14 (12.88) (range, 0.46–56.01) in the OSCC group and 0.33 (1.3) (range, 0–6.77) in the control group. This difference was statistically significant (Mann-Whitney U test = 26, $p < 0.001$) (Fig. 1).

ATP6VIC1 expression levels increased with higher tumor stage (Fig. 2). The mean (SD) expression was 3.85 (3.36) (range, 0.63–9.43) for stage I tumors; 12.55 (11.42) (range, 3.21–29.00) for stage II tumors; 10.69 (9.58) (range, 0.46–27.71) for stage III tumors; and 20.08 (17.15) (range, 4.13–56.01) for stage IV tumors.

No statistically significant associations were detected between *ATP6VIC1* levels and sex, tumor location or smoking.

Diagnostic yield analysis. As described in the materials and methods section, ROC curve analysis was used to determine the ability of *ATP6VIC1* levels to discriminate between healthy individuals and patients with OSCC. The AUC was 0.9746, which indicates the high diagnostic yield of measuring *ATP6VIC1* expression in such cases (Fig. 3).

Figure 4 shows the cutoff for *ATP6VIC1* expression in relation to the sensitivity and specificity values at these points.

As can be seen in Table 1, for a cutoff of 0.218, both sensitivity and specificity were 90.63%. Nonetheless, for the same cutoff, there was a high rate of false positives, an important consideration given that the test would be performed in clinical settings in individuals with potentially malignant lesions. We also calculated the likelihood ratios for each cutoff to analyze the discriminative ability of the test. For an *ATP6VIC1* expression cutoff of 0.5, which had a sensitivity of 81.5% and a specificity of 93.7%, the LR^+ and LR^- levels were 30 and 0.06, respectively.

Logistic regression analysis was used to analyze the diagnostic yield of measuring *ATP6VIC1* levels to discriminate between patients with OSCC and healthy individuals. We also analyzed whether diagnostic yield improved with the inclusion of other variables in the model. Specifically, we added sex and smoking to the baseline model, which included *ATP6VIC1* only.

The diagnostic yield values for a cutoff of 0.5 for the baseline model are shown in Table 2.

The results for the model including *ATP6VIC1* expression and smoking are shown in Table 3. As can be seen, both test validity and diagnostic accuracy increased, as did overall

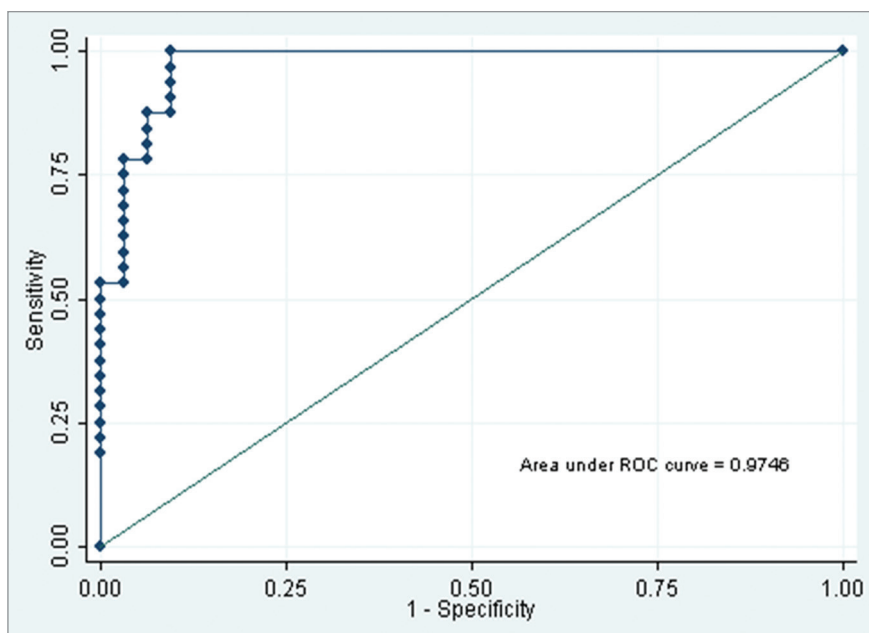


Figure 3. Receiver operating characteristic curve showing sensitivity versus inverse of specificity. The optimal values are close to 1 for sensitivity and close to 0 for the inverse of specificity. The closer to 1 the area under the curve (AUC) value is, the greater the suitability of the test for the purpose studied. In our case, the AUC was 0.9746, clearly indicating that the measurement of *ATP6VIC1* expression is an effective manner of discriminating between healthy individuals and patients with OSCC.

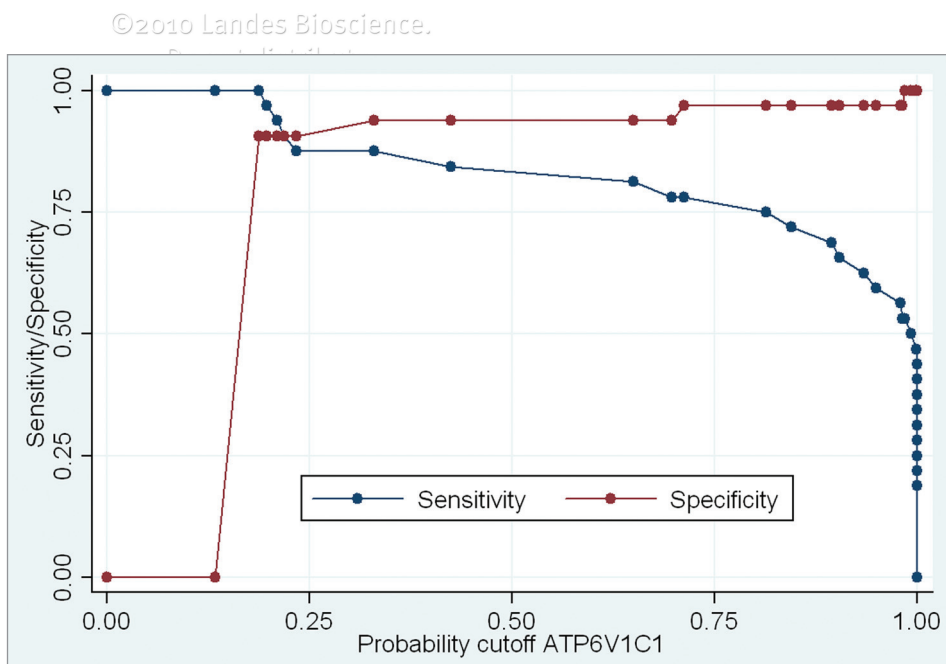


Figure 4. Graph showing sensitivity values (blue line) and specificity values (red line) for *ATP6VIC1* expression cutoffs.

diagnostic yield (accuracy of 95.31 compared to 87.50 in the baseline model).

The likelihood ratios based on the model incorporating *ATP6VIC1* and smoking were $LR^+ = 30$ and $LR^- = 0.06$. In

Table 1. Sensitivity and specificity values for different *ATP6V1C1* expression cutoffs

<i>ATP6V1C1</i> expression	Sensitivity	Specificity	LR ⁺	LR ⁻
0.813002	0.750000	0.968750	23.44	0.26
0.696819	0.781250	0.937500	12.45	0.23
0.711953	0.781250	0.968750	24.41	0.23
0.500000	0.812500	0.937500	30	0.06
0.329883	0.875000	0.937500	14	0.13
0.233310	0.875000	0.906250	9.33	0.14
0.218178	0.906250	0.906250	9.66	0.16

Table 2. Diagnostic yield values based on *ATP6V1C1* expression only, with a cutoff of 0.5 for a sample to be considered OSCC

Diagnostic yield	Values %
Sensitivity	81.25
Specificity	93.75
Positive Predictive Value (PPV)	92.86
Negative Predictive Value (NPV)	83.33
Accuracy	87.50

Table 3. Diagnostic yield values based on *ATP6V1C1* expression and smoking, with a cutoff of 0.5 for a sample to be considered OSCC

Diagnostic yield	Values %
Sensitivity	93.75
Specificity	96.88
Positive Predictive Value (PPV)	96.77
Negative Predictive Value (NPV)	93.44
Accuracy	95.31

other words, a clinician would be 30 times as likely to diagnose a patient with a positive result as OSCC positive than as OSCC negative. By contrast, a clinician would only be 0.06 times as likely to diagnose a patient with a negative result as OSCC positive than as OSCC negative.

Discussion

It was recently shown that RNA could be extracted from cells obtained by brush cytology and proposed that this method would be useful in the early diagnosis of premalignant and cancerous oral lesions.^{37,38} While the analysis of RNA in saliva offers advantages in that samples are easy to obtain, it does not provide a direct measure of gene expression in tissue.^{39,40} The saliva analysis test measures extracellularly stable RNA via the identification of disease markers but sheds no light on possible causes.⁴¹ The analysis of RNA obtained from brush cytology specimens, in contrast, can be used to isolate live cells from sites with a risk of disease. Early changes that characterize disease progression that affect gene expression can thus be detected using a minimally invasive technique.⁴² Spivack et al.⁴³ concluded that RNA

obtained by brush cytology was of value in determining susceptibility to cancer in healthy populations, detecting markers in the early stages of carcinogenesis, and evaluating the efficacy or toxicity of chemopreventive or chemotherapeutic agents via the analysis of gene expression in cytology samples.

The only statistically significant association we detected for the presence of disease in the study group was male sex. Nonetheless, no statistical inferences can be drawn regarding epidemiological or sociodemographic data given the small sample size.

ATP6V1C1 levels were significantly higher in the OSCC group than in the control group, confirming the main hypothesis of this study. Levels were also significantly higher in advanced-stage tumors (stages III and IV) than in early-stage ones (stages I and II). The increase in expression levels grew with increasing tumor stage, a finding consistent with the idea that tumors with lower levels of differentiation have lower pH values, obliging cells to express higher levels of V-ATPase in order to survive in the acidic microenvironment.^{22,44}

We found that *ATP6V1C1* levels in brush cytology samples from patients with OSCC were significantly higher than in oral mucosa samples from healthy individuals. It is difficult to compare our findings with others as no studies to date have analyzed *ATP6V1C1* levels in OSCC let alone in brush cytology samples. Just a few studies have analyzed OSCC using microarrays containing cDNA sequences for *ATP6V1C1*,⁴⁵⁻⁴⁷ but none of these validated their results.

The tests performed to examine diagnostic yield (sensitivity, specificity, predictive values and likelihood ratios) all confirmed that the measurement of *ATP6V1C1* levels was an effective method for distinguishing between patients with OSCC and healthy individuals. The improved results obtained when smoking was included in the logistic regression model indicates that tobacco influences OSCC and probably transcript levels. We believe that this preliminary study is a necessary step towards advancing knowledge on strategies to not only differentiate OSCC samples from healthy oral mucosa samples, but also to distinguish OSCC from precancerous lesions such as leukoplakia, erythroplasia or erosive lichen planus.

In order to present our results within a relevant context, thus, we have performed a review of the literature regarding the important role played by V-ATPases, and the C1 subunit in particular, in solid tumors in terms of pH control, multiple drug resistance (MDR), and the possible therapeutic applications associated with the use of specific V-ATPase inhibitors.

Role of V-ATPases in the control of pH and metastasis. Extracellular pH in patients with OSCC is slightly acidic (around 6.8–7.0), as has been previously described for solid tumors in animal models. Becelli et al.⁴⁸ found that reversed pH gradient was directly related to resistance to chemotherapy agents. To survive in this microenvironment, tumor cells need to be able to regulate cytosolic pH. This may explain why V-ATPases, which are normally located in acidic organelles, may also reside on the cell surface, where they regulate pH and increase the migratory capacity of metastatic cells.^{22,44} This is accompanied by a parallel increase in intracellular pH in addition to an increase in DNA synthesis,⁴⁹⁻⁵¹ cell cycle progression,⁵²⁻⁵⁴ serum- and substrate-

independent growth⁴⁹ and in vivo tumor growth,^{49,55} leading to a pathological increase and a disruption in cell density and number. Such an environment increases the invasive capacity of the tumor and the expression of growth and angiogenic factors/receptors, and promotes the transition to a more aggressive, metastatic phenotype.⁵⁶

Many tumor cells secrete lysosomal enzymes that participate in the degradation of the extracellular matrix required for metastatic invasion. These enzymes have a low optimal pH and it is V-ATPases that are responsible for acidifying the microenvironment.^{58,59} To become metastatically competent, cells must acquire motility and an invasive phenotype.^{56,57} A reduction in extracellular pH in the tumor microenvironment has been seen to increase tumor cell motility through the formation of pseudopodia, leading to more invasive cell migration. In metastatic cells, this extracellular acidification also induces an increase in the number and length of pseudopodia,⁶⁰ which project in the direction of movement of the tumor cells, i.e., towards the circulatory capillaries⁶¹ (Fig. 5).

Chemoresistance. Resistance to chemotherapy agents is one of the main reasons for treatment failure in patients with cancer, and multidrug resistance (MDR) occurs in many types of tumors. The main mechanism that gives rise to the MDR phenotype is the overexpression of drug efflux transporters such as the P glycoprotein (Pgp) in the plasma membrane. While a clear association has been established between MDR and Pgp expression in some tumors, the mechanism by which drug resistance occurs within the multistep process of OSCC has not yet been fully elucidated.⁶² Several genes have been implicated in MDR, including *MDR1*, *MRP*, *GST-π* and *DNA topoisomerase II*. Nonetheless, it has been hypothesized that hypoxia and acidity may contribute to the transition from benign to malignant growth, inducing the selection of tumor cells capable of surviving in an acidic, oxygen-deprived environment. Acidity, for example, has been associated with chemotherapy resistance,¹² proliferation¹⁴ and metastatic behavior.¹¹ Indeed, alteration of the pH gradient between the extracellular environment and the cell cytoplasm has been suggested as a possible mechanism of resistance to cytotoxic drugs.¹³

Recent studies have suggested that V-ATPases, may play a key role in the acidification of the tumor environment. Several human tumor cells are characterized by increased V-ATPase expression and activity, and pretreatment with proton pump inhibitors (PPIs) has been found to sensitize tumor cell lines to the effect of different chemotherapy drugs.^{13,63–65}

It is also known that low pH levels are suitable for the complete activation of PPIs,⁶⁶ suggesting that tumor alkalization may be an extremely interesting target for future anticancer treatments.^{13,63,64}

There is scientific evidence that suggests that the acidic tumor microenvironment holds the key to cancer management in terms of disease progression and metastasis. Of all the mechanisms that regulate this microenvironment, V-ATPases are key targets as they can be inhibited by RNA interference and PPIs. While there are many pH regulator inhibitors, V-ATPase inhibitors have proven to be the most efficient as V-ATPases are the main regulators of pH.^{20,22,62} Specific V-ATPase inhibitors such as concanamycin

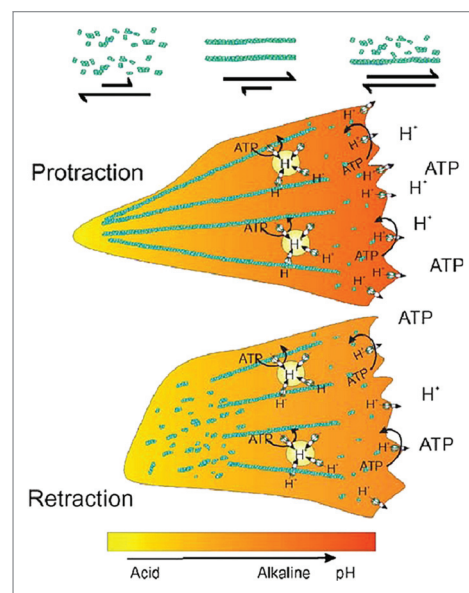


Figure 5. Proposed mechanism by which overexpression of pmV-ATPase at the leading edge of the cell modulates cell migration/invasion. The proposed model should be viewed as a framework to explain how pmV-ATPases determine the acquisition of an invasive phenotype needed for angiogenesis and metastasis. Changes in pH_{cyt} are critical for establishing cell polarity needed for cell movement. A critical step in directed motility and migration is the asymmetric actin polymerization at the leading edge. Increase in pH_{cyt} promotes recruitment of cofilin and dynamic actin remodeling at the leading edge of migratory cells. Therefore, the pH_{cyt} fluctuations that are needed to control dynamic assembly/disassembly of microtubules/microfilaments will allow protrusion at the leading edge and retraction at the lagging edge by changing the rigidity of the cytoskeleton structure favoring the sol-gel transition. Also, the high density of pmV-ATPase at the leading migratory edge in invasive cells suggests that there is increased acidity at the extracellular milieu via pmV-ATPase. This acid release provides an optimum extracellular environment for proteases to degrade the extracellular matrix and therefore allow cell invasion.⁶⁰

and bafilomycins are other candidates for investigation, not only to treat cancer but also to reduce MDR in tumors.²⁰

Materials and Methods

Patient selection and clinical data. The study group consisted of 16 patients histopathologically diagnosed with OSCC at the maxillofacial surgery department of the Complejo Hospitalario Universitario in Santiago de Compostela, Spain. None of the group had received previous chemotherapy or radiotherapy.

The control group was formed by 16 volunteers, all students at the faculty of medicine and dentistry at the University of Santiago de Compostela. A clinical history was obtained in all cases and the oral cavity examined to check for the absence of disease. Individuals with systemic or oral cavity disease were excluded.

The following information was collected from the participants' clinical histories: age; sex; smoking (defined by 4 categories: those who had been smoking for more than 5 years; those who had quit smoking in the last 10 years; those who had quit smoking over 10 years ago; and those who had never smoked);

tumor site (mobile portion of tongue, base of tongue, gum, floor of mouth, cheek and retromolar trigone); tumor stage (according to the fifth edition of the American Joint Committee on Cancer's Cancer Staging Manual).

The present study was approved by the clinical research ethics committee of Galicia, Spain. All the participants were informed of the nature of the study and signed the corresponding informed consent form. No identifying data were recorded, thus guaranteeing the anonymity of participants.

Sample collection. A cytological sample was taken by the same person from all participants (both patients and controls) for molecular analysis of *ATP6V1C1* expression. In the control group, the samples were taken by vigorous brushing (10–15 rotations) of the jugal mucosa using a cytology brush (Cytobrush; Medscand Medical, Madrid, Spain). In the OSCC group, the samples were also taken using the Cytobrush but directly from the lesion. Local anesthesia was not required and none of the patients reported any discomfort during the procedure.

Processing of samples. The brush cytology samples were used for the molecular (RNA) study. RPMI-1640 medium (Microvet, Madrid, Spain), which is designed to maintain numerous cell lines, was used to transport and store the samples. For optimal conservation, samples should be stored at between 2°C and 10°C and protected from light.

Nucleic acid extraction and reverse transcription were used to obtain complementary DNA (cDNA) for subsequent analysis of *ATP6V1C1* expression. All experiments were performed in duplicate.

The method used requires the isolation of messenger RNA from each sample, the preparation of cDNA using reverse transcriptase, and the amplification of specific cDNA from a housekeeping. The selected gene was *ABL* (Abelson), which was also analyzed via RT-PCR. The steps followed are described below.

(1) *Extraction of total RNA.* To extract total RNA, the samples were centrifuged at 12,000 rpm for 1 minute. After removal of the supernatant, the cell pellet was processed using an RNeasy mini kit (Quiagen, Hilden, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions. RNA integrity was checked by electrophoresis run through 1% agarose gel.

(2) *Reverse transcription.* The RNA collected was converted to cDNA through a reverse transcription reaction using AMV reverse transcriptase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and random primers (Roche Diagnostics). The mixture was incubated at 37°C for 1 hour and following the denaturation of transcriptase at 65°C for 10 minutes, the resulting cDNA was stored at -20°C until needed.

(3) *Real-time quantification.* For PCR analysis, 5 µL of reverse transcription mix was mixed with 15 µL of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) containing 250 nM of primers and 125 nM of TaqMan probe, which

are specific for the *ABL* and *ATP6V1C1* gene, respectively. For quantification purposes, we used the ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A standard commercial curve (*ABL* FusionQuant Standards; Ipsogen, New Haven, USA) was used to quantify the *ABL* gene. To quantify the *ATP6V1C1* gene, a calibration curve was generated using serial dilutions (1, 1/100, 1/1,000, 1/10,000) from a sample taken from a control. The values used to determine the threshold cycle were measured using the ABI 7300 System and the corresponding SDS software.

(4) *Normalization of data.* The expression curves for each gene were normalized by comparison with the curves for the housekeeping gene (*ABL*). The results were expressed as the relationship between the number of copies of *ATP6V1C1* and the number of copies of *ABL*. A value of 0 indicated that the gene was not expressed in a given sample.

Statistical analysis. All analyses were performed using the STATA 11 software package (StataCorp LP, Texas, USA). Quantitative variables were described using means or medians and standard deviations and categorical variables were described using frequencies and percentages. The univariate analysis includes several statistical tests depending on the application conditions. For the analysis of predictive value of *ATP6V1C1* expression in oral mucosa brush cytology samples, we use the Receiver Operating Characteristic (ROC) curves to analyze which *ATP6V1C1* expression cutoffs had the best predictive ability (area under the curve [AUC] closest to 1). Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values were calculated to assess the validity of the test and diagnostic accuracy. Positive likelihood ratios (LR⁺) and negative likelihood ratios (LR⁻) were also estimated, using the following formulas:

$$RV^+ = \text{Sensitivity} / (1 - \text{Specificity})$$

$$RV^- = (1 - \text{Sensitivity}) / \text{Specificity}$$

Conclusions and Perspectives

We confirmed that the *ATP6V1C1* gene was significantly overexpressed in patients with OSCC compared to healthy controls by performing qRT-PCR analysis of brush cytology samples. There was also a statistically significant relationship, characterized by an increasing gradient, between *ATP6V1C1* levels and tumor stage. ROC curve analysis indicated that the measurement of *ATP6V1C1* expression is a highly sensitive and specific means of discriminating between OSCC samples and normal oral mucosa samples. Despite its obvious limitations, this preliminary study provides a solid and necessary basis for future studies analyzing the value of measuring *ATP6V1C1* levels to detect early-stage OSCC through the identification of precancerous lesions as well as strategies aimed at limiting metastasis and MDR based on RNA interference or the use of specific V-ATPase inhibitors.

References

1. Kosicki DM, Riva C, Pajarola GF, Burkhardt A, Gratz KW. OralCDx brush biopsy—a tool for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2007; 117:222-7.
2. Robinson PN, Mickelson AR. Early diagnosis of oral cavity cancers. *Otolaryngol Clin North Am* 2006; 39:295-306.
3. Bundgaard T, Bentzen SM, Wildt J. The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in intra-oral squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1994; 30:323-8.
4. Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, von Eggeling F, Muller-Richter U, Kosmehl H, Reichert TE. Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *J Dtsch Dermatol Ges* 2007; 5:1095-100.
5. Remmerbach TW, Hemprich A, Bocking A. Minimally invasive brush-biopsy: Innovative method for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2007; 117:926-40.

6. Spafford MF, Koch WM, Reed AL, Califano JA, Xu LH, Eisenberger CF, et al. Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells by microsatellite analysis. *Clin Cancer Res* 2001; 7:607-12.
7. Navone R, Burlo P, Pich A, Pentenero M, Broccolotti R, Marsico A, Gandolfo S. The impact of liquid-based oral cytology on the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma. *Cytopathology* 2007; 18:356-60.
8. Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Mol Cancer* 2006; 5:11.
9. Acha A, Ruesga MT, Rodriguez MJ, Martinez de Pancorbo MA, Aguirre JM. Applications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and precancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005; 10:95-102.
10. Perez-Sayans M, Somoza-Martin J, Barros-Angueira F, Reboiras-Lopez M, Gandara-Vila P, Rey JG, Garcia-Garcia A. Exfoliative cytology for diagnosing oral cancer. *Biotech Histochem* 2009; 1-11.
11. Martinez-Zaguilan R, Sefior EA, Sefior RE, Chu YW, Gillies RJ, Hendrix MJ. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 1996; 14:176-86.
12. Raghunand N, Mahoney B, van Sluis R, Baggett B, Gillies RJ. Acute metabolic alkalosis enhances response of C3H mouse mammary tumors to the weak base mitoxantrone. *Neoplasia* 2001; 3:227-35.
13. De Milito A, Fais S. Proton pump inhibitors may reduce tumour resistance. *Expert Opin Pharmacother* 2005; 6:1049-54.
14. Morita T, Nagaki T, Fukuda I, Okumura K. Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutat Res* 1992; 268:297-305.
15. Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Uramoto H, Yoshida Y, Tanabe M, et al. Cellular pH regulators: Potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 2003; 29:541-9.
16. Torigoe T, Izumi H, Ise T, Murakami T, Uramoto H, Ishiguchi H, et al. Vacuolar H(+)-ATPase: Functional mechanisms and potential as a target for cancer chemotherapy. *Anticancer Drugs* 2002; 13:237-43.
17. Gillies RJ, Raghunand N, Karcmar GS, Bhujwalla ZM. MRI of the tumor microenvironment. *J Magn Reson Imaging* 2002; 16:430-50.
18. Newell K, Franchi A, Pouyssegur J, Tannock I. Studies with glycolysis-deficient cells suggest that production of lactic acid is not the only cause of tumor acidity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:1127-31.
19. Yamagata M, Hasuda K, Stamato T, Tannock IF. The contribution of lactic acid to acidification of tumours: Studies of variant cells lacking lactate dehydrogenase. *Br J Cancer* 1998; 77:1726-31.
20. Perez-Sayans M, Somoza-Martin JM, Barros-Angueira F, Rey JM, Garcia-Garcia A. V-ATPase inhibitors and implication in cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 2009; 35:707-13.
21. Nelson N. A journey from mammals to yeast with vacuolar H(+)-ATPase (V-ATPase). *J Bioenerg Biomembr* 2003; 35:281-9.
22. Saroussi S, Nelson N. Vacuolar H(+)-ATPase—an enzyme for all seasons. *Pflugers Arch* 2008.
23. Smith AN, Borthwick KJ, Karet FE. Molecular cloning and characterization of novel tissue-specific isoforms of the human vacuolar H(+)-ATPase C, G and d subunits, and their evaluation in autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Gene* 2002; 297:169-77.
24. Otero-Rey EM, Somoza-Martin M, Barros-Angueira F, Garcia-Garcia A. Intracellular pH regulation in oral squamous cell carcinoma is mediated by increased V-ATPase activity via overexpression of the ATP6V1C1 gene. *Oral Oncol* 2008; 44:193-9.
25. Svergun DI, Konrad S, Huss M, Koch MH, Wiczeorek H, Altendorf K, et al. Quaternary structure of V1 and F1 ATPase: Significance of structural homologies and diversities. *Biochemistry* 1998; 37:17659-63.
26. Armbruster A, Svergun DI, Coskun U, Juliano S, Bailer SM, Gruber G. Structural analysis of the stalk subunit Vma5p of the yeast V-ATPase in solution. *FEBS Lett* 2004; 570:119-25.
27. Chaban YL, Juliano S, Boekema EJ, Gruber G. Interaction between subunit C (Vma5p) of the yeast vacuolar ATPase and the stalk of the C-depleted V(1) ATPase from *manduca sexta* midgut. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1708:196-200.
28. Zhang Z, Inoue T, Forgac M, Wilkens S. Localization of subunit C (Vma5p) in the yeast vacuolar ATPase by immuno electron microscopy. *FEBS Lett* 2006; 580:2006-10.
29. Drory O, Frolov F, Nelson N. Crystal structure of yeast V-ATPase subunit C reveals its stator function. *EMBO Rep* 2004; 5:1148-52.
30. Peng S, Stone D, Xie X. Reconstitution of recombinant 40-kDa subunit of the clathrin-coated vesicle H(+)-ATPase. *J Biol Chem* 1993; 268:23519-23.
31. Gruber G. Structural features and nucleotide-binding capability of the C subunit are integral to the regulation of the eukaryotic V1Vo ATPases. *Biochem Soc Trans* 2005; 33:883-5.
32. Armbruster A, Hohn C, Hermesdorf A, Schumacher K, Borsch M, Gruber G. Evidence for major structural changes in subunit C of the vacuolar ATPase due to nucleotide binding. *FEBS Lett* 2005; 579:1961-7.
33. Voss M, Vitavska O, Walz B, Wiczeorek H, Baumann O. Stimulus-induced phosphorylation of vacuolar H(+)-ATPase by protein kinase A. *J Biol Chem* 2007; 282:33735-42.
34. Beltran C, Kopecky J, Pan YC, Nelson H, Nelson N. Cloning and mutational analysis of the gene encoding subunit C of yeast vacuolar H(+)-ATPase. *J Biol Chem* 1992; 267:774-9.
35. Perez-Sayans M, Garcia-Garcia A, Reboiras-Lopez MD, Gandara-Vila P. Role of V-ATPases in solid tumors: Importance of the subunit C (review). *Int J Oncol* 2009; 34:1513-20.
36. Somoza-Martin JM, Garcia-Garcia A, Barros-Angueira F, Otero-Rey E, Torres-Espanol M, Gandara-Vila P, et al. Gene expression profile in oral squamous cell carcinoma: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63:786-92.
37. Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM, et al. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995; 332:429-35.
38. Patel K, Rhodus NL, Gaffney P, Ondrey F. Extraction of RNA from oral biopsies in oral leukoplakia. *IADR Congress* 2004; 1240-1.
39. Ballantyne J. Validity of messenger RNA expression analyses of human saliva. *Clin Cancer Res* 2007; 13:1350-1.
40. Laine ML, Farre MA, Crusius JB, van Winkelhoff AJ, Pena AS. The mouthwash: A non-invasive sampling method to study cytokine gene polymorphisms. *J Periodontol* 2000; 71:1315-8.
41. Brinkman BM, Wong DT. Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 2006; 18:228-33.
42. Schwartz JL, Panda S, Beam C, Bach LE, Adami GR. RNA from brush oral cytology to measure squamous cell carcinoma gene expression. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2008; 37:70-7.
43. Spivack SD, Hurteau GJ, Jain R, Kumar SV, Aldous KM, Gierthy JF, Kaminsky LS. Gene-environment interaction signatures by quantitative mRNA profiling in exfoliated buccal mucosal cells. *Cancer Res* 2004; 64:6805-13.
44. Nelson N, Harvey WR. Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. *Physiol Rev* 1999; 79:361-85.
45. Mendez E, Cheng C, Farwell DG, Ricks S, Agoff SN, Futran ND, et al. Transcriptional expression profiles of oral squamous cell carcinomas. *Cancer* 2002; 95:1482-94.
46. Hwang D, Alevizos I, Schmitt WA, Misra J, Ohshima H, Todd R, et al. Genomic dissection for characterization of cancerous oral epithelium tissues using transcription profiling. *Oral Oncol* 2003; 39:259-68.
47. Warner GC, Reis PP, Jurisica I, Sultan M, Arora S, Macmillan C, et al. Molecular classification of oral cancer by cDNA microarrays identifies overexpressed genes correlated with nodal metastasis. *Int J Cancer* 2004; 110:857-68.
48. Becelli R, Renzi G, Morello R, Altieri F. Intracellular and extracellular tumor pH measurement in a series of patients with oral cancer. *J Craniofac Surg* 2007; 18:1051-4.
49. Reshkin SJ, Bellizzi A, Caldeira S, Albarani V, Malanchi I, Poignee M, et al. Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J* 2000; 14:2185-97.
50. Hagag N, Lacal JC, Graber M, Aaronson S, Viola MV. Microinjection of ras p21 induces a rapid rise in intracellular pH. *Mol Cell Biol* 1987; 7:1984-8.
51. Ober SS, Pardee AB. Intracellular pH is increased after transformation of chinese hamster embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:2766-70.
52. Reshkin SJ, Bellizzi A, Albarani V, Guerra L, Tommasino M, Paradiso A, Casavola V. Phosphoinositide 3-kinase is involved in the tumor-specific activation of human breast cancer cell na⁺/h⁺ exchange, motility and invasion induced by serum deprivation. *J Biol Chem* 2000; 275:5361-9.
53. Siczkowski M, Davies JE, Ng LL. Activity and density of the Na⁺/H⁺ antiporter in normal and transformed human lymphocytes and fibroblasts. *Am J Physiol* 1994; 267:745-52.
54. Doppler W, Jaggi R, Groner B. Induction of v-mos and activated ha-ras oncogene expression in quiescent NIH 3T3 cells causes intracellular alkalinisation and cell cycle progression. *Gene* 1987; 54:147-53.
55. Pouyssegur J, Franchi A, Pages G. pHi, aerobic glycolysis and vascular endothelial growth factor in tumour growth. *Novartis Found Symp* 2001; 240:186-96.
56. Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ. The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:786-95.
57. Sennoune SR, Martinez-Zaguilan R. Plasmalemmal vacuolar H⁺-ATPases in angiogenesis, diabetes and cancer. *J Bioenerg Biomembr* 2007; 39:427-33.
58. Nishi T, Forgac M. The vacuolar (H⁺)-ATPases—nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:94-103.
59. Martinez-Zaguilan R, Lynch RM, Martinez GM, Gillies RJ. Vacuolar-type H(+)-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 1993; 265:1015-29.
60. Glunde K, Guggino SE, Solaiyappan M, Pathak AP, Ichikawa Y, Bhujwalla ZM. Extracellular acidification alters lysosomal trafficking in human breast cancer cells. *Neoplasia* 2003; 5:533-45.
61. Condeelis J, Segall JE. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:921-30.
62. Ling V. Multidrug resistance: Molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; 40:3-8.
63. Luciani F, Spada M, De Milito A, Molinari A, Rivoltini L, Montinaro A, et al. Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:1702-13.
64. De Milito A, Fais S. Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors. *Future Oncol* 2005; 1:779-86.
65. Sennoune SR, Luo D, Martinez-Zaguilan R. Plasmalemmal vacuolar-type H⁺-ATPase in cancer biology. *Cell Biochem Biophys* 2004; 40:185-206.

-
66. De Milito A, Iessi E, Logozzi M, Lozupone F, Spada M, Marino ML, et al. Proton pump inhibitors induce apoptosis of human B-cell tumors through a caspase-independent mechanism involving reactive oxygen species. *Cancer Res* 2007; 67:5408-17.

©2010 Landes Bioscience.
Do not distribute.